



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

Expresión de OmpA recombinante de *Chlamydia abortus* en *Escherichia coli*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

Cinthy Isabel Santiago Barrientos

TUTOR PRINCIPAL:

Efrén Díaz Aparicio
INIFAP-CENID Microbiología Animal

COMITÉ TUTOR:

Erika Margarita Carrillo Casas
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Laura Cobos Marín
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, 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 donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Para Salvador, por acompañarme durante este largo y complicado viaje que fue la Maestría. Gracias por estar en los mejores momentos, pero aún más te agradezco alentarme durante los peores. Este logro también es tuyo, porque gracias al impulso que me dabas cada día para seguir adelante, hoy puedo culminar esta etapa.

A mi papás Leticia y Tobias, y a mis hermanas Ana y Nayely, esta meta no habría sido posible sin su presencia, gracias por confiar en que lo lograría a pesar de todos los obstáculos, y gracias por estar siempre que los necesito.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Dr. Efrén Díaz Aparicio agradezco su consideración para este proyecto y el apoyo brindado para realizarlo.

A mi comité tutorial, Dra. Laura Cobos Marín, agradezco sus comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo; y M en C. Erika Margarita Carrillo Casas, quiero agradecerle por revisar este trabajo de forma exhaustiva, por compartir sus conocimientos y su tiempo conmigo, por alentarme a seguir adelante a pesar de los obstáculos que se presentaron, su presencia fue fundamental para mi formación.

Al personal del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” que siempre me brindó su apoyo y una mano amiga durante mi estancia, a la M en C. Margarita Leyva Leyva, agradezco infinitamente su asesoría en las técnicas de SDS-PAGE y WB, gracias por escucharme y darme los mejores consejos; también agradezco a la Dra. Angélica Olivo Díaz, al Dr. Ricardo González Ramírez y a la Dra. Andrea Herrera Solís, tanto por proporcionarme material de apoyo como por los comentarios certeros para mi beneficio. Además, agradezco a mi compañero de laboratorio, MVZ. Víctor Alfonso Vázquez Aceituno, por todas las horas de trabajo que compartimos y por hacer amena mi estancia. En especial, quiero dar las gracias al Dr. Rigoberto Hernández Castro por propiciar las condiciones para realizar este trabajo, mil gracias por apoyarme, aconsejarme, y por todo el tiempo compartido.

Al equipo del Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal, del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Juan Xicotécatl Cortés, Dr. Víctor Manuel Luna Pineda y a la M en C. Vicenta Cázares Domínguez, gracias por recibirme en su laboratorio y por todo el apoyo para realizar la clonación.

A mi jurado, Dr. Erasmo Negrete Abascal, Dra. Ina Marcela Figueroa Ochoa y Dr. Víctor Manuel Díaz Sánchez, por el tiempo otorgado para la revisión de este trabajo.

Al CONACYT, por la beca proporcionada durante mi estancia en el programa, número de becario 785350.

CONTENIDO

RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	20
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
7. RESULTADOS.....	29
8. DISCUSIÓN.....	38
9. CONCLUSIONES.....	43
10. PERSPECTIVAS.....	43
11. FUENTES DE CONSULTA.....	44
12. ANEXOS.....	55

RESUMEN

SANTIAGO BARRIENTOS CINTHYA ISABEL. Expresión de OmpA recombinante de *Chlamydia abortus* en *Escherichia coli* (Bajo la asesoría de Dr. Efrén Díaz Aparicio, M en C. Erika Margarita Carrillo Casas y Dra. Laura Cobos Marín).

Chlamydia abortus es el agente causal del aborto enzoótico de los pequeños rumiantes, este es inducido en el último tercio de la gestación, y provoca muerte fetal o el nacimiento de crías débiles. En México, esta enfermedad está clasificada como endémica. Sin embargo, su diagnóstico es limitado y es necesario desarrollar alternativas diagnósticas que permitan un monitoreo constante de la clamidiosis caprina. El objetivo de este trabajo fue expresar la proteína principal de membrana externa (OmpA) de *C. abortus* en *E. coli*, para ser utilizada en un futuro como antígeno en una prueba serológica. Se estandarizó y optimizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen *ompA*, que codifica para esta proteína. Se usó como template ADN de la cepa NED14/0251-12 de *C. abortus*, donado por la Universidad Complutense de Madrid, España. El producto de PCR fue purificado y clonado en el vector de expresión pLATE31. A continuación, la construcción se usó para transformar por electroporación células *E. coli* BL21. Se analizó la construcción por restricción enzimática con las enzimas *EcoRV*, *BamHI* y *ClaI*, y la construcción fue secuenciada en el Instituto de Biotecnología (UNAM). La expresión de la proteína se indujo con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido en concentración de 1 mM y se obtuvo la sobre-expresión máxima de la proteína de ~38 kDa a las 5 h post-inducción. Se realizó la técnica de *Western blot* con un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (anti-6xHis) que identificó la proteína de ~38 kDa.

Palabras clave: *Chlamydia*, *Chlamydia abortus*, OmpA, clonación, proteína recombinante

ABSTRACT

SANTIAGO BARRIENTOS CINTHYA ISABEL. Expression of recombinant OmpA of *Chlamydia abortus* in *Escherichia coli* (Advisors: Dr. Efrén Díaz Aparicio, MSc. Erika Margarita Carrillo Casas and Dr. Laura Cobos Marín).

C. abortus is the causal agent of enzootic abortion on small ruminants. It induces abortion in the third part of the pregnancy, fetal death and the birth of weak kids. Currently in Mexico, the disease is classified as endemic. However, the available diagnosis methods are restricted, and the development of other methods for the surveillance of caprine chlamydiosis is mandatory. The aim of this work was to express the major outer membrane protein (OmpA) of *C. abortus* in *E. coli*. A polymerase chain reaction (PCR) was standardized and optimized to amplify the *ompA* gene. The DNA template was DNA from strain NED14/0251-12 of *C. abortus*, kindly donated by *Universidad Complutense de Madrid*, Spain. The PCR product was purified and cloned into the pLATE31 expression vector. Further, the construction was electroporated into *E. coli* BL21. The insertion was analyzed by enzymatic restriction with *EcoRV*, *BamHI* and *ClaI*. The construction was sequenced at the *Instituto de Biotecnología (UNAM)* and the right direction and phase of the insert was validated. The expression of the recombinant protein was carried out through induction with isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside 1 mM. The overexpression of the ~38 kDa protein was best obtained at 5 h post-induction. The Western blot was performed with an anti-6xHis Tag monoclonal antibody.

Key words: *Chlamydia*, *Chlamydia abortus*, OmpA, cloning, recombinant protein

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Ciclo de desarrollo de <i>Chlamydia</i> spp	6
Figura 2. Modelo de la membrana externa de un cuerpo elemental	7
Figura 3. Esquema de OmpA en la membrana externa de la pared celular de <i>Chlamydia</i>	8
Figura 4. Gen <i>ompA</i> de <i>C. abortus</i> cepa S26/3	22
Figura 5. Vector de expresión pLATE31	24
Figura 6. Amplificación de <i>ompA</i> de <i>C. abortus</i> por PCR	29
Figura 7. Construcción <i>in silico</i> pLATE/ <i>ompACa</i>	30
Figura 8. PCR de colonia	31
Figura 9. Restricción enzimática en gel de agarosa al 1% de la construcción pLATE/ <i>ompACa</i>	32
Figura 10. Alineamiento de secuencias.....	34
Figura 11. Inducción de <i>E. coli</i> BL21-pLATE/ <i>ompACa</i>	35
Figura 12. <i>Western blot</i> con anti-6xHis	36
Figura 13. Determinación de la solubilidad de la proteína	37
Cuadro 1. Características básicas del género <i>Chlamydia</i>	1
Cuadro 2. Diagnósticos serológicos basados en OmpA	19

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
AEPR	aborto enzoótico de pequeños rumiantes
CE	cuerpo elemental
CR	cuerpo reticular
COMC	complejo de membrana externa chlamydial
DOF	Diario Oficial de la Federación
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
LPS	lipopolisacárido
ME	membrana externa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PR	proteína recombinante
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
SST3	sistema de secreción tipo 3
WB	western blot

1. INTRODUCCIÓN

Chlamydia es una bacteria Gram-negativa, intracelular obligada, con un ciclo de desarrollo bifásico, que consiste en un cuerpo elemental (CE), que es la forma extracelular infecciosa, y un cuerpo reticular (CR) o forma intracelular no infecciosa (Pospischil, *et al.*, 2010).

El género *Chlamydia* tiene 11 especies: *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. suis* y *C. trachomatis* (Sachse *et al.*, 2015). Las diferentes especies de este género tienen un amplio rango de hospederos y tropismos variables (Beeckman *et al.*, 2014). Causan múltiples enfermedades crónicas y agudas. Entre estas enfermedades se encuentran los trastornos reproductivos, respiratorios, cardiovasculares, gastrointestinales y enfermedades sistémicas; así como conjuntivitis, artritis y encefalitis en humanos, animales de producción, especies de compañía y fauna silvestre (Cuadro 1) (Everett, 1999; Wheelhouse y Longbottom, 2012; Sachse *et al.*, 2014; Sachse *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Características básicas del género *Chlamydia*
(Adaptado de Sachse *et al.*, 2015)

	Hospedero natural	Otros hospederos	Sitio de infección
<i>C. abortus</i>	Ovino, caprino	Bovino, porcino	Sistema genital y respiratorio
<i>C. avium</i>	Paloma, loro		Sistema respiratorio
<i>C. caviae</i>	Cobayo	Equino	Ocular y sistema reproductor
<i>C. felis</i>	Felino		Ocular y sistema respiratorio
<i>C. gallinacea</i>	Gallina	Otras aves de corral	Sistema respiratorio
<i>C. muridarum</i>	Roedor		Sistema gastrointestinal
<i>C. pecorum</i>	Bovino, koala	Ovino, caprino, porcino	Sistema gastrointestinal, respiratorio y genital
<i>C. pneumoniae</i>	Humano, equino, koala	Anfibio, reptil	Sistema respiratorio y cardiovascular
<i>C. psittaci</i>	Aves	Mamífero	Sistema respiratorio
<i>C. suis</i>	Porcino	Rumiante	Sistema gastrointestinal y genital
<i>C. trachomatis</i>	Humano		Ocular

Chlamydia abortus

C. abortus es el agente causal del aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR), este es inducido en el último tercio de la gestación, también puede provocar el nacimiento de crías débiles (Rodolakis y Mohamad, 2010). El AEPR causa considerables pérdidas económicas en la industria pecuaria, ya que representa una de las principales causas de pérdida de corderos y cabritos en algunas partes de Europa, América del Norte y África (Longbottom y Coulter, 2003). En un rebaño recién infectado, aproximadamente un tercio de las ovejas y más del 60 % de las cabras gestantes presentarán signología. La incidencia de casos de aborto persiste durante dos o tres años, hasta que una gran proporción de las hembras del rebaño ha abortado. Entonces, la enfermedad adquiere un carácter cíclico, ya que las ovejas y las cabras generalmente abortan una vez, posteriormente desarrollan inmunidad protectora (Appleyard *et al.*, 1985; Rodolakis y Souriau, 1980). En esos casos, los abortos afectan a menos del 10 % de las hembras gestantes durante los años siguientes, hasta que una gran proporción de hembras primíparas o recién introducidas abortan.

C. abortus también se ha asociado con casos de epididimitis, neumonía, artritis, conjuntivitis y ha sido aislada de heces de ovinos y caprinos sanos (Souriau *et al.*, 1993; Salinas *et al.*, 1995; Salti-Montesanto *et al.*, 1997). Además, esta enfermedad es una zoonosis, se ha reportado un caso de neumonía atípica en humanos (Ortega *et al.*, 2016), y en mujeres infectadas durante el embarazo produce un cuadro febril grave que lleva al aborto (Buxton, 1986; Rodolakis y Mohamad, 2010).

El AEPR fue reportado por primera vez en el año 1936, en un rebaño de ovinos en Escocia, no obstante, los abortos se atribuían a factores ambientales y deficiencias nutricionales (Greig, 1936). Sin embargo, en 1950 se demostró que era una enfermedad infecciosa, aunque debido a su morfología e incapacidad de multiplicarse en medios inertes este agente infeccioso fue conocido como un virus del grupo linfgranuloma venéreo psitacoso (LGV) (Stamp *et al.*, 1950). No fue sino hasta 1966 que se demostró que los microorganismos del grupo LGV son bacterias intracelulares sin relación con los virus, y que presentan pared celular similar a las bacterias Gram-negativas, división celular por fisión binaria, un ciclo de desarrollo diferente al de un virus, y poseen ribosomas con susceptibilidad a antibióticos, como otros procariontes (Moulder, 1966).

El género *Chlamydia* dentro de la familia Chlamydiaceae y el orden Chlamydiales (phylum Chlamydiae) fue introducido por Page en 1966 (Page, 1966); y se conformó por las dos especies reconocidas hasta entonces: *C. psittaci* y *C. trachomatis*, posteriormente en los años 80 se identificó a *C. pecorum* y *C. pneumoniae* (Fukushi y Hirai, 1992). En 1999, basado en el análisis de secuencias de genes de ARN ribosomal (ARNr), Everett y colaboradores propusieron subdividir la familia Chlamydiaceae en dos géneros, *Chlamydia* y *Chlamydophila*, más la adición de 5 especies nuevas. La familia quedó integrada por nueve especies: *C. trachomatis*, *C. muridarum* y *C. suis*; *Chlamydophila (Cp) psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. caviae*, *Cp. felis*, *Cp. pecorum* y *Cp. pneumoniae* (Everett *et al.*, 1999).

Si bien la extensión de especies fue ampliamente aceptada por la comunidad científica, la introducción de dos géneros diferentes fue cuestionada debido a que los umbrales de identidad de las secuencias 16S de ARNr propuesto para otros taxones bacterianos no separan consistentemente a las especies *Chlamydia* de *Chlamydophila*, el genoma de ambos miembros de Chlamydiaceae son muy similares, los valores de identidad de la secuencia de ARNr de los miembros conocidos varían de 93.0 % a 99.7 % para el ARNr 16S, y de 91.8% a 99.5 % para el ARNr 23S, los valores del porcentaje de proteínas conservadas entre los miembros de ambos géneros son del 82 % y además no existen características fenotípicas claras que se distingan entre ellos (Sachse *et al.*, 2015). Por consenso, el género ha sido reunificado en *Chlamydia* con la adición de tres nuevas especies recientemente descritas, *C. avium* y *C. gallinacea* (Sachse *et al.*, 2014), así como '*Candidatus C. ibidis*' (Vorimore *et al.*, 2013).

Situación del AEPR en México

En México, el AEPR se encontraba clasificado por el Diario Oficial de la Federación, en el grupo 1 del “Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria”. Este grupo, está compuesto por las enfermedades y plagas que no se encuentran en el territorio nacional (DOF, 1999).

En 1997, se realizó el primer reporte de aislamiento de *C. psittaci* serotipo 1 -ahora conocida como *C. abortus*- a partir de abortos caprinos en el estado de Querétaro (Escalante *et al.*,

1997) y en 2005, en el estado de Michoacán se aisló a partir de una muestra de heces (Lazcano-Arrebillaga, 2006). Además, se ha determinado la presencia de anticuerpos contra *C. abortus* y se ha identificado el microorganismo mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de hisopos vaginales, tanto en rebaños ovinos con historial abortivo en el Estado de México (Jiménez-Estrada, 2008), como en rebaños caprinos del Estado de Guanajuato (Campos-Hernández *et al.*, 2014; Mora-Díaz *et al.*, 2015) y más recientemente la presencia de anticuerpos contra este agente en equinos del estado de México y de la Ciudad de México (Rubio-Navarrete *et al.*, 2017).

A partir del 29 de Noviembre de 2018 esta enfermedad ha sido reclasificada por el DOF, dentro del grupo 3, el cual está constituido por aquellas enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y son consideradas como endémicas (DOF, 2018).

CICLO DE DESARROLLO

Chlamydia presenta un ciclo de desarrollo bifásico único, en el que además se puede identificar una tercera forma aberrante o persistente que ha sido observada en ensayos *in vitro*, donde los CR tras diversos estímulos son capaces de mantenerse por más tiempo dentro de la célula hospedera (Wheelhouse y Longbottom, 2012).

Los CE son estructuras esféricas, pequeñas (0.3 μm), caracterizadas por un núcleo denso y excéntrico de ADN, una membrana lipídica citoplásmica y una membrana externa rígida que los hace osmóticamente más estables y menos permeables que los CR, lo que les permite sobrevivir varios meses fuera de la célula hospedera (Costerton *et al.*, 1976; Longbottom y Coulter, 2003).

La diferenciación de CE a CR implica una expansión que genera un citoplasma menos denso, en el que el núcleo no se distingue claramente, los CR son transcripcionalmente más activos y, como consecuencia, el citoplasma contiene más ARN y ribosomas, necesarios para la síntesis de proteínas (Abdelrahman y Belland, 2005). Los CR metabólicamente activos no son infecciosos y se replican intracelularmente por fisión binaria (Beeckman *et al.*, 2014).

El ciclo de desarrollo inicia con la endocitosis del CE por una célula eucariota, la unión a la célula hospedera involucra varios ligandos bacterianos y receptores del hospedero. Al

contacto, la bacteria genera proyecciones del sistema de secreción tipo III (SST3) que inyectan proteínas efectoras pre-sintetizadas y el CE es internalizado mediante una vesícula endocítica, llamada inclusión (Hackstadt, 2012; Elwell *et al.*, 2016). En pocas horas (6-8 h post-infección) se realiza la transición de CE a CR, por la remodelación de su membrana y posteriormente (8-16 h post-infección) la bacteria se divide por fisión binaria para que posteriormente la inclusión se expanda substancialmente. En la última etapa (24-72 h post-infección), los CR después de diversas divisiones se reorganizan nuevamente a CE, que serán liberados de la célula hospedera mediante lisis o extrusión. Además, el ciclo de desarrollo puede verse afectado por factores ambientales y estrés, como privación de nutrientes, exposición a antibióticos, y citocinas como el interferón-gamma (IFN- γ) (Mpiya y Ravaoarino, 2006) desencadenando la transición de CR a una tercera forma de desarrollo, conocida como, cuerpo persistente. Una vez que se elimina el factor de inducción de estrés, los cuerpos persistentes vuelven a CR, y continúan su ciclo de desarrollo hasta CE infecciosos. Figura 1. (Escalante-Ochoa *et al.*, 1998; Beeckman *et al.*, 2014; Elwell *et al.*, 2016).

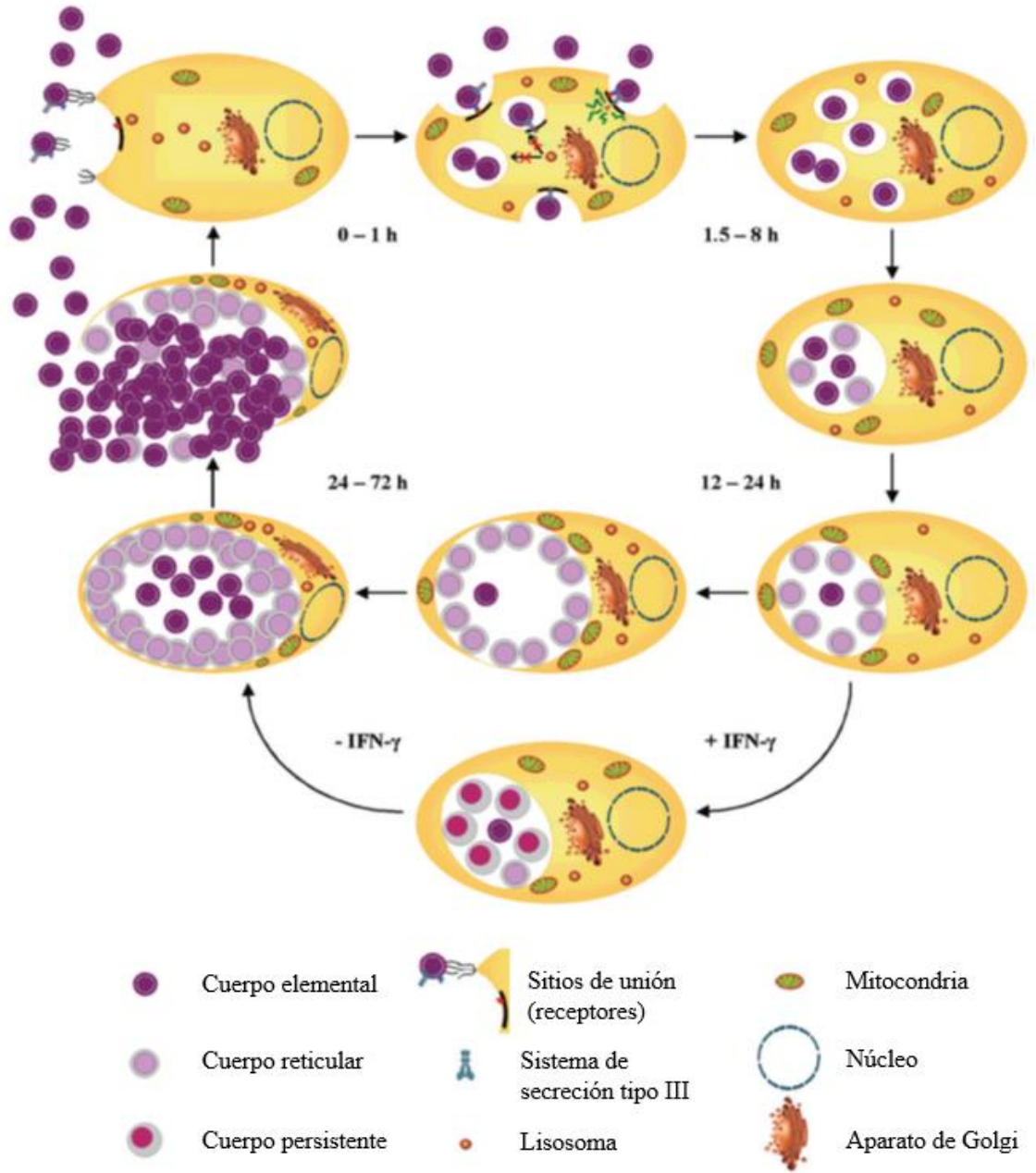


Figura 1. Ciclo de desarrollo de *Chlamydia* spp. (Tomado de Beeckman *et al.*, 2014)

Composición de la membrana celular

Las bacterias del género *Chlamydia* son Gram-negativas, están rodeadas por dos membranas, una interna y una externa, separadas por un espacio periplásmico. La membrana externa de los CE está formada por fosfolípidos, lípidos, lipopolisacáridos y proteínas (Nelson *et al.*, 2012; Beeckman *et al.*, 2014). En contraste a otras bacterias Gram-negativas, *Chlamydia* tiene escaso ácido murámico (Barbour *et al.*, 1982; Fox *et al.*, 1990), además de una cantidad insignificante de peptidoglicano (Moulder, 1991).

Parte de la membrana externa de *Chlamydia* es insoluble al detergente iónico lauroil sarcosinato de sodio, también conocido como sarkosyl, y esta fracción se denomina Complejo de Membrana Externa Chlamydial (COMC). Este complejo está formado por la proteína principal de membrana externa (OmpA), proteínas ricas en cisteína (CRP; por sus siglas en inglés, *Cysteine Rich Proteins*) OmcA y OmcB (Omc, por sus siglas en inglés, *Outer membrane complex*); y por proteínas polimórficas de membrana (Pmp; por sus siglas en inglés, *Polimorphic membrane proteins*) (Hatch *et al.*, 1984; Sardinia *et al.*, 1988; Beeckman *et al.*, 2014). Además la membrana externa está compuesta por lipopolisacáridos (LPS), PorB, Omp85, las proteínas de choque térmico Hsp60 y Hsp70 (Beeckman *et al.*, 2014) Figura 2.

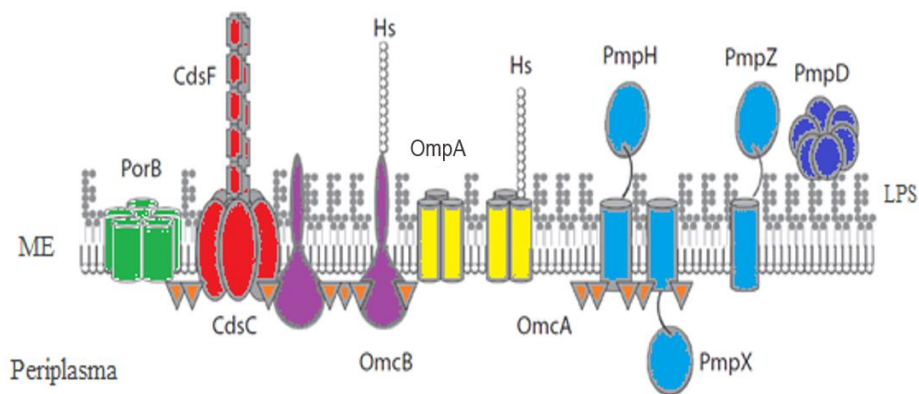


Figura 2. Modelo de la membrana externa de un cuerpo elemental (Modificado de Nelson, 2012). ME = Membrana externa, PorB = Porina B, CdsF y CdsC = Proteínas del SST3, OmpA, OmcB, OmcA = Proteínas del COMC, PmpH, PmpX, PmpD, PmpZ = proteínas polimórficas, LPS= Lipopolisacárido Hs= proteínas de choque térmico.

Proteína principal de membrana externa (OmpA)

La proteína OmpA representa el 60 % de la superficie en la membrana externa del CR, de todos los miembros del género *Chlamydia* (Baehr *et al.*, 1988). Inicialmente se identificó como la proteína principal de membrana externa (MOMP; por sus siglas en inglés, *Major outer membrane protein*), en lo sucesivo nos referiremos a ella como OmpA.

OmpA es codificada por el gen *ompA*. Es una proteína con estructura de barril β antiparalelo de 16 cadenas (Feher *et al.*, 2013). Su peso oscila los 40 kDa, se caracteriza por tener cuatro secuencias variables (I a IV), y cinco regiones intermedias de estructura constante (Figura 3) (Vanrompay *et al.*, 2004; Everett *et al.*, 1991). OmpA contiene de 8 a 10 residuos de cisteína - según la especie de *Chlamydia* spp. (Hepler *et al.*, 2018) y se ha demostrado que estos residuos forman enlaces disulfuro intermoleculares, formando monómeros y trímeros, e intramoleculares con otras proteínas ricas en cisteína, lo que aumenta la rigidez estructural de la membrana externa (Yen *et al.*, 2005). Tiene función como porina y adhesina mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas no específicas con la célula hospedera (Su *et al.*, 1990).

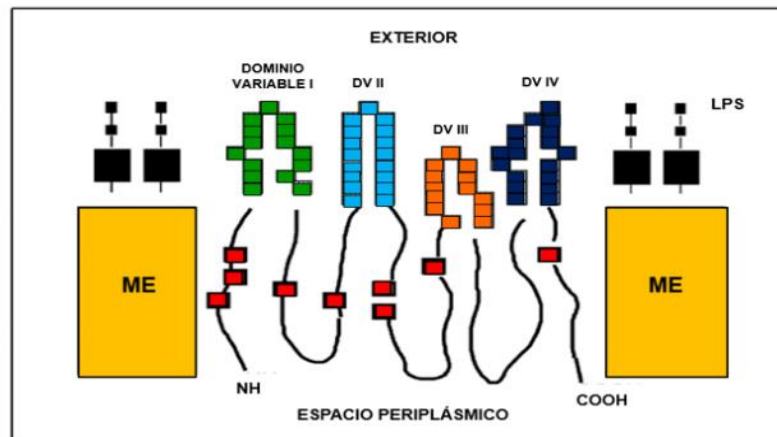


Figura 3. Esquema de OmpA en la membrana externa de la pared celular de *Chlamydia* (Modificado de Vanrompay *et al.*, 2004). Línea sólida: cadena peptídica de OmpA incrustada en la membrana (no dibujado a escala con respecto al espesor de la membrana o al tamaño de los dominios variables (DVI-IV)). Los cuadrados a colores representan los residuos que comprenden los dominios variables; DVI en verde, DVII en azul cian, DVIII en naranja y DVIV azul añil. Los cuadrados rojos representan los residuos de cisteína conservados y los bloques negros por encima de la membrana externa (ME) representan la presencia de estructuras de LPS en Chlamydiaceae.

Debido a que OmpA posee epítopes específicos de especie y de serotipo (Baehr *et al.*, 1988; Zhang y Stephens, 1992), existe evidencia de que los anticuerpos contra estos epítopes tienen un papel protector en la inmunidad a la infección (Caldwell *et al.*, 1981; Baehr *et al.*, 1988), por lo cual es candidata potencial para el desarrollo de vacunas y estrategias terapéuticas (Beeckman *et al.*, 2014).

Proteínas ricas en cisteína

El segundo componente más importante del COMC, son las proteínas ricas en cisteína: La proteína OmcA, con peso molecular de 9 kDa, es codificada por el gen *omp3* y posee 14 residuos de cisteína (Hatch *et al.*, 1984; Findlay *et al.*, 2005). La proteína OmcB, con peso molecular de 60 kDa, es codificada por el gen *omp2* y posee 37 residuos de cisteína.

Los primeros estudios de OmcA y OmcB establecían su localización a nivel de periplasma (Everett *et al.*, 1991). El trabajo de Hegemann y Moelleken, 2012 identificó que OmcB induce una fuerte respuesta de anticuerpos y es fácilmente accesible en la superficie del CE. La proteína OmcB está altamente conservada en las especies de *Chlamydia* y desempeña un papel importante en la adhesión a las células de mamíferos mediante la unión a heparina (Hegemann y Moelleken, 2012).

Proteínas polimórficas de membrana externa (Pmps)

Las Pmps son un grupo de proteínas expuestas en la superficie de la membrana que se expresan con masas moleculares entre 85, 90 y 105 kDa, se han caracterizado como adhesinas autotransportadoras y son importantes en la fase inicial de la infección, ya que actúan como citolisinas que contribuyen a la lisis de la célula hospedadora y a la salida del CE (Marques *et al.*, 2010; Villegas *et al.*, 2008).

Todas las especies de *Chlamydia* expresan Pmps y son polimórficas debido a que sus genes sufren mutaciones que originan variaciones en su estructura, el número de genes de esta familia varía de acuerdo a la especie: hay 18 genes *pmp* en *C. abortus*, 22 genes en *C. psittaci*, 16 en *C. pneumoniae* y 9 en *C. trachomatis*. Estas proteínas contienen motivos tetrapeptídicos conservados; el primero, formado por dos glicinas, una alanina y, en la última posición una isoleucina, leucina o valina, G G A (I, L, V); y el segundo es un motivo formado

por una fenilalanina, dos aminoácidos variables y una asparagina (F x x N), ambos en su porción N-terminal (Vasilevsky *et al.*, 2016).

Las Pmps inducen respuestas específicas de tipo celular y humoral, lo que las hace potenciales candidatas como antígenos para vacunas. Por otra parte, debido a su especificidad y a la fuerte reacción contra estas proteínas que muestran los sueros policlonales de ovejas infectadas experimental o naturalmente con *C. abortus*, se han usado como antígenos de diagnóstico para diferenciar aquellas infecciones provocadas por *C. abortus* en rumiantes de las provocadas por *C. pecorum* (Villegas *et al.*, 2008; Martínez, 2006; Wheelhouse *et al.*, 2012).

Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) está compuesto por un glicolípido que es compartido por todas las especies de *Chlamydia* (Nurminen *et al.*, 1983; Kosma, 1999). El LPS clamidial es estable al calor; posee estructuras parecidas a las encontradas en bacterias Gram-negativas y está formado por tres componentes principales: una porción lipídica (Lípido A), un núcleo oligosacárido compuesto de heptulosa, glucosa, galactosa, glucosamina y ácido ceto-3-desoxi-2-octulosónico (KDO) y una parte final polisacárida denominada antígeno “O” muy variable (Brade y Rietschel, 1984).

El LPS tiene al menos cuatro epítopes, dos específicos para el género *Chlamydia* y dos compartidos con mutantes de otras Gram-negativas (Nurminen *et al.*, 1983). Estudios inmunocitoquímicos y de inmunoblot muestran que el LPS está presente tanto en CE como en CR (Kosma, 1999). En la cepa *C. abortus* AB7 (antes *C. psittaci* AB7), causante de aborto en ovinos, Salinas y colaboradores identificaron que los epítopes de LPS se localizan principalmente en la porción externa del CR e interna del CE (Salinas *et al.*, 1994).

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Chlamydia tiene un genoma altamente conservado y reducido, de 1.04 Mb en *C. trachomatis* y 1.14 Mb en *C. abortus* (Stephens *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 2005), en el que aproximadamente dos tercios de sus proteínas se comparten entre especies. Una diferencia significativa es la “zona de plasticidad”, una región con alta diversidad genómica que codifica una matriz de factores de virulencia (Elwell *et al.*, 2016).

Adhesión

Los patógenos intracelulares obligados dependen de estructuras superficiales especializadas para mediar sus interacciones específicas con células eucariotas. La invasión exitosa de *Chlamydia* requiere la adhesión inicial del CE a la célula hospedera como inicio del ciclo de desarrollo intracelular (Hackstadt, 1999).

La unión del CE a la superficie de la célula hospedera consta de dos pasos individuales: una interacción electrostática reversible inicial con glicosaminoglicanos (GAG) parecidos al sulfato de heparano (Zhang y Stephens, 1992; Su *et al.*, 1996), seguido de una unión irreversible dependiente de la temperatura de un ligando de *Chlamydia* a un receptor desconocido de la célula hospedera que induce la internalización del CE (Hegemann y Moelleken, 2012).

Los receptores específicos de las células hospedadoras y ligandos de *Chlamydia* implicados en la unión irreversible del CE a la célula hospedadora, no han sido del todo identificados. Actualmente, posibles ligandos bacterianos incluyen la proteína principal de membrana externa OmpA (Su *et al.*, 1990), la proteína de choque térmico (Hsp70), la proteína de membrana externa OmcB y proteínas polimórficas, como Pmp21 (PmpD), Pmp6 y Pmp20 (Wehrl *et al.*, 2004; Moelleken y Hegemann, 2008). Los componentes de translocación del SST3 (CopB, CopD y LcrV) también podrían servir como adhesinas (Hegemann y Moelleken, 2012).

Inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma

Normalmente un fagosoma profesional o no profesional, que ha incluido a un patógeno se fusionará con un lisosoma, posteriormente el fagolisosoma resultante producirá hidrolasas

ácidas para erradicar el patógeno. *Chlamydia* spp. ha desarrollado un mecanismo para frustrar de manera eficiente esta fusión fagolisosomal.

El microambiente dentro de la vacuola que contiene a *Chlamydia* es modificado por este microorganismo. Después de la internalización inicial, la inclusión no se acidifica y se mantiene aislada de la ruta lisosómica endosómica (Heinzen *et al.*, 1996; Escalante-Ochoa *et al.*, 1998). Esta ausencia de acidificación previene la formación de la vesícula endosómica portadora (Clague *et al.*, 1994), una vesícula grande y esférica, que regula el paso del endosoma temprano a tardío (Aniento *et al.*, 1993).

Sistemas de secreción

Chlamydia codifica, en su genoma, un gran número de proteínas efectoras de virulencia, las cuales comprenden aproximadamente el 10 % (Betts-Hampikian y Fields, 2010). Estas son liberadas a través de sistemas de secreción especializados a la superficie bacteriana, el lumen de la inclusión, la membrana de inclusión, y al citoplasma de la célula hospedera (Fields, 2012).

Sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (SST3) es una jeringa molecular que permite la inyección directa de proteínas efectoras bacterianas a través de las membranas del hospedador (Mueller, *et al.* 2014). *Chlamydia* spp. usa el SST3 durante el contacto inicial de la célula hospedera con la membrana plasmática y durante la fase intracelular, en la que los efectores se inyectan en el citoplasma de la célula hospedera y acceden a otros compartimentos intracelulares, incluido el núcleo (Fields, 2012).

A diferencia de otras bacterias, en las que los genes para el SST3 están contenidos en plásmidos de virulencia (Hueck, 1998), en *Chlamydia* las secuencias codificantes del SST3 están dispersas en el cromosoma (Peters *et al.*, 2007). Este SST3 está conformado por, el inyectisoma, el aparato translocador y subclases de chaperonas (Ghosh, 2004).

El inyectisoma es una 'nanojeringa' formada por varias proteínas, entre ellas CdsJ, que abarca el espacio periplásmico y se asocia con las proteínas integrales de membrana CdsR-V, y la proteína de membrana interna CdsD; además posee un anillo compuesto por CdsC, que es

necesario para que la aguja atravesase la membrana externa y forme estructuras hexámicas similares a las estructuras 'tipo roseta' observadas por Matsumoto (Matsumoto, 1982; Tanzer y Hatch, 2001).

Entre las proteínas que permiten la translocación de efectores secretados a través de la membrana plasmática de la célula se encuentran CopB y CopB2 (Peters *et al.*, 2007), mientras que las principales proteínas efectoras secretadas son; la fosfoproteína de reclutamiento de actina (Tarp), que participa en la inclusión de *C. trachomatis* al inducir cambios tempranos en el citoesqueleto durante su internalización en la célula eucariota (Clifton *et al.*, 2005); y las proteínas de inclusión de membrana IncA, IncB e IncC, que median las interacciones hospedero-patógeno (Hackstadt, 2012; Moore y Ouellette, 2014) como la reorganización del citoesqueleto de la célula eucariota, el anclaje del centrosoma, la adquisición de lípidos y la resistencia a la apoptosis (Moore y Ouellette, 2014).

Sistema de secreción tipo V

Este sistema ha sido denominado como ruta de autotransporte. Este mecanismo requiere la secreción dependiente de Sec de sustratos al periplasma. Un dominio de barril β C-terminal de la proteína efectora media la inserción posterior en la membrana externa y la visualización del dominio pasajero funcional en la superficie bacteriana. La familia de proteínas polimórficas de membrana externa (Pmp) ejemplifica los autotransportadores del género (Tanzer y Hatch, 2001). Este grupo diverso de proteínas de superficie ha sido implicado en la adhesión (Wehrl *et al.*, 2004) y la respuesta inmune (Tan *et al.*, 2010).

Resistencia a antibióticos

En la mayoría de los casos, las infecciones por *Chlamydia* spp. se pueden resolver fácilmente mediante el tratamiento con antibióticos como los derivados de tetraciclina y macrólidos (especialmente azitromicina). Sin embargo, en algunos casos el tratamiento no es exitoso (Jones *et al.*, 1990; Di Francesco *et al.*, 2008) y con frecuencia se observa resistencia heterotípica, que se define como resistencia en la que solo una pequeña porción de la población muestra el fenotipo resistente. La resistencia a los fármacos a menudo surge a través de mutaciones puntuales, alterando la expresión o la funcionalidad del objetivo del

antibiótico, o siguiendo la inserción de genes de resistencia en el genoma bacteriano. La adquisición de resistencia a los antibióticos en *Chlamydia* spp. requiere mayor investigación, ya que hasta el momento sólo hay evidencia de que la transferencia horizontal de genes está presente en la resistencia a tetraciclina en *C. suis* (Dugan *et al.*, 2004; Dugan *et al.*, 2007).

Inhibición e inducción de la apoptosis

Debido a su estilo de vida intracelular, la apoptosis de la célula hospedera afecta la capacidad de *Chlamydia* spp. para completar su ciclo de replicación. Se ha descrito que la proteína clamidial CPAF (por sus siglas en inglés, *chlamydial protease-like activity factor*) actúa en la inhibición de la apoptosis de la célula hospedera, al degradar las proteínas proapoptóticas BH3, secuestrar proteínas proapoptóticas e inducir la expresión de factores antiapoptóticos *in vitro* (Byrne y Ojcius, 2004; Miyairi y Byrne, 2006). La evasión de la apoptosis favorece que la bacteria complete su ciclo de replicación y evita la liberación de CR no infecciosos (Roan y Starnbach, 2008).

Por otra parte, existe evidencia de que *Chlamydia* participa en la inducción de la vía apoptótica de las células infectadas vía TNF- α con el fin de liberar CE infecciosos a una célula hospedera adyacente (Perfettini *et al.*, 2000). Además, la apoptosis puede ser inducida por la expresión de la proteína asociada con el dominio de muerte, la cual se asocia a los receptores de muerte de la célula eucariota (Byrne y Ojcius, 2004; Miyairi y Byrne, 2006).

RESPUESTA INMUNE

Las células epiteliales infectadas por *Chlamydia* spp. reconocen antígenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR; por sus siglas en inglés, *pattern recognition receptor*) presentes en su superficie, en el endosoma o en el citoplasma (Elwell *et al.*, 2016). Los PRR mejor caracterizados son los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés: *toll like receptors*). Aunque el LPS de *C. trachomatis* puede ser reconocido por TLR4 (Prebeck *et al.*, 2003), TLR2 parece ser esencial para señalar la producción de citocinas proinflamatorias después de la infección por *Chlamydia*, no obstante, el patrón molecular asociado a patógenos (PAMP; por sus siglas en inglés, *pathogen-associated molecular*

patterns) de *Chlamydia* que señala a través de TLR2, aún no se ha identificado (O'Connell *et al.*, 2006).

La proteína de choque térmico Hsp60 es reconocida por TLR4, y el NOD1 intracelular también se activa en respuesta a la infección, aunque los ligandos clamidiales correspondientes no se han identificado (Buchholz y Stephens, 2006). Estos PRR tras la unión del ligando, activan una variedad de vías de señalización inflamatorias que incluyen NF- κ B e IL-6 (Darville y O'Connell, 2012).

Además, desencadenan la liberación de citocinas proinflamatorias, como la IL-8, que recluta células inmunes innatas clásicas (Buchholz y Stephens, 2006), estas incluyen células NK y fagocitos tales como neutrófilos, que se han encontrado en las primeras etapas de infección primaria por *C. abortus* (Buxton *et al.*, 1990; Buendía *et al.*, 2004).

El interferón (IFN- γ), controla la replicación de *Chlamydia* al aumentar el potencial fagocítico de los macrófagos, promoviendo así su fagocitosis y la destrucción de los CE extracelulares (Darville y O'Connell, 2012).

Las células dendríticas (CD), también son eficientes en el procesamiento y la presentación de antígenos de *Chlamydia* a las células T. Por lo tanto, las CD proporcionan un vínculo esencial entre la inmunidad innata y la adaptativa (Steele *et al.*, 2004).

Esta inmunidad innata no solo actúa como una defensa de primera línea sino que también es capaz de conducir a una inmunidad específica mediante la secreción de diferentes citocinas y el reclutamiento de subtipos de células T (Buendía *et al.*, 2004).

Se ha identificado que las subpoblaciones de células T que participan en la respuesta inmune adaptativa contra *Chlamydia* spp., varían según la especie (Del Río *et al.*, 2001). La infección por *C. abortus* y *C. pneumoniae*, es controlada principalmente por una respuesta Th1, caracterizada por la producción temprana de altas concentraciones de IFN- γ (McCafferty *et al.*, 1994), así como la presencia de células T, particularmente CD8+, que han demostrado ser cruciales para la eliminación de la infección (Del Río *et al.*, 2001). En el caso de la respuesta inmune contra *C. trachomatis* esta es controlada por células T CD4+ (Su y Caldwell, 1991).

Los CE y los CR de *Chlamydia* en el espacio extracelular y aun dentro de la célula hospedera, son fagocitados por células presentadoras de antígeno profesionales (APC; por sus siglas en inglés, *antigen presenting cell*), que posteriormente son presentados a las células T CD4+. Por el contrario, las células T CD8+ típicamente reconocen antígenos que tienen acceso al citoplasma de las células infectadas. Estos antígenos son procesados por el proteosoma en fragmentos, que son transportados a la superficie de la célula en complejos con MHC clase I para activar células T CD8+ (Cresswell *et al.*, 2005).

El papel desempeñado por la inmunidad humoral contra *C. abortus* ha sido poco estudiado, aunque se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales contra OmpA neutralizan la infección por *Chlamydia in vitro* (Peeling *et al.*, 1984; Moore *et al.*, 2003).

TRANSMISIÓN

Entre animales el contagio se da por ingestión de CE contenidos en secreciones vaginales y membranas placentarias al momento del parto o del aborto, o bien, a través de aerosoles (Caro *et al.*, 2009; Kerr *et al.*, 2005). Una vez que la bacteria ingresa al organismo, el principal sitio de infección y multiplicación son las tonsilas; también puede infectar y multiplicarse en las células del sistema reticuloendotelial, células epiteliales de la mucosa conjuntival, células sinoviales, en células de placenta, feto, genitales y del tracto intestinal (Longbottom y Coulter, 2003).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico presuntivo de infección por *C. abortus* se realiza cuando la historia clínica del rebaño y el carácter de las lesiones de la placenta en el aborto sugieren un aborto enzoótico, y se ha eliminado la posibilidad de que otros agentes infecciosos o causas no infecciosas estén involucradas. Sin embargo, el diagnóstico preciso requiere confirmación a través de pruebas de laboratorio (Sachse *et al.*, 2009).

Las muestras en las que se puede llevar a cabo la identificación del agente son: cotiledones infectados, membranas placentarias, pulmón o hígado fetal, y secreciones vaginales. Estas muestras son conservadas a 4 °C en medio de transporte SPG compuesto por

sacarosa/fosfato/glutamato, suplementado con 10 % de suero fetal bovino, antibióticos como estreptomycin (200 mg/mL) y gentamicina (50 mg/mL), y un inhibidor fúngico (Spencer y Johnson, 1983; OIE, 2018; Alonso *et al.*, 2012).

Frotis

Se pueden preparar frotis a partir de membranas placentarias y cotiledones, o de hisopos tomados de la vagina en el momento del aborto (Longbottom y Coulter, 2003). Estos pueden ser teñidos por técnicas como la de Maquiavelo modificado, Giménez, o Ziehl-Neelsen modificado (Stamp *et al.*, 1950; Gimenez, 1964; Aitken y Longbottom, 2004; Andersen y Vanrompay, 2000). Con Ziehl-Neelsen modificado, se observan al microscopio pequeños cuerpos elementales cocoides (300 nm) rojos/rosas aislados o en grupo, destacando sobre un fondo azul de restos celulares (Sachse *et al.*, 2009).

Aislamiento en embrión de pollo

Chlamydia spp. requiere técnicas de cultivo en tejidos para aislamiento y propagación en líneas celulares o por inoculación de embrión de pollo (Thejls *et al.*, 1994).

Para realizar el aislamiento en embrión de pollo, se inoculan los sacos vitelinos de embriones de 6 a 8 días de edad, con 0.2 mL de una suspensión de la muestra al 10 % en medio SPG. La muerte de estos embriones se da entre el día 4 y 14 post-infección. La presencia de CE se observa en las improntas preparadas a partir de los sacos vitelinos congestionados; también se pueden apreciar hemorragias en las membranas y en la piel del embrión (García de la Fuente, 2003; OIE, 2018). Posteriormente, se realiza el frotis a partir de las membranas del saco vitelino en el momento de la muerte, o de los huevos sobrevivientes al finalizar el ensayo (Stamp *et al.*, 1950; Gimenez, 1964).

Cultivo celular

C. abortus se cultiva en gran variedad de líneas celulares, entre las más utilizadas están las células McCoy, fibroblastos de ratón L929, y células de riñón de hámster neonato (BHK; por sus siglas en inglés, *baby hamster kidney*) (Longbottom y Coulter, 2003).

Brevemente, una suspensión bacteriana se inocula sobre una monocapa de 2×10^5 células/mL previamente cultivada sobre un cubreobjetos de 16 mm. Se incuba 24 horas a 37 °C o hasta obtener una monocapa confluyente sobre el cubreobjetos. Se elimina el medio de crecimiento y se centrifuga a 2500 x g durante 30 min para favorecer la infección sobre la monocapa. Después de incubar 2–3 días, la monocapa se fija con metanol o acetona/metanol y se tiñe con Giemsa o se realiza un ensayo de Inmunofluorescencia (Arens y Weingarten, 1981). Los cultivos celulares son la “prueba de oro” para el diagnóstico y permiten el seguimiento de la infección, con identificación del efecto citopático y la observación de inclusiones intracitoplasmáticas en células teñidas con anticuerpos monoclonales fluorescentes. Además, posibilitan la titulación de las unidades formadoras de inclusiones (UFI).

Diagnóstico serológico.

Dentro de los métodos más utilizados para la detección de anticuerpos anti-*Chlamydia* en sueros de animales, se encuentran las pruebas de inmunofluorescencia indirecta, los inmunoensayos enzimáticos (ELISA) y la fijación del complemento, que detectan la respuesta inmune humoral, principalmente al LPS y de antígenos proteicos específicos de género, especie o serotipo (Buendía *et al.*, 2001).

La fijación del complemento está basada en el LPS, un título superior a 1/32 es indicativo de la presencia de AEPR, los valores por debajo de este título pueden deberse a infecciones entéricas subclínicas por *C. abortus* o reactividad cruzada con *C. pecorum* y otros LPS como el de *E. coli* y *Salmonella* spp. (Aitken y Longbottom, 2004). La prueba de fijación de complemento (FC) no es viable con sueros hemolíticos o anti-complementarios (Cross y Clafin, 1963). Además, no todos los sueros animales o todos los isotipos de inmunoglobulina pueden fijar el complemento (Schmeer *et al.*, 1987; Kaltenboeck *et al.*, 1997).

ELISA

Los ensayos disponibles incorporan diversos antígenos de *Chlamydia* como el LPS purificado, la proteína OmpA (Cuadro 2) y las POMP. Su desventaja está en que ofrece baja especificidad de especie. Entre sus ventajas, presentan una mayor sensibilidad que la prueba de FC, facilita el diagnóstico serológico de rebaños completos, la automatización y la

objetividad de interpretación al utilizar un espectrofotómetro (Buendía *et al.*, 2001; Longbottom *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Diagnósticos serológicos basados en *OmpA*

Nombre	Fundamento	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia
ELISAc	Ac monoclonales contra DVI y DVII	-	100	Salti-Montesanto <i>et al.</i> , 1997
ELISAc	Ac monoclonales contra DVI y DVII	77.7	98.1	Vretou <i>et al.</i> , 2007
Panclabort o MOMP-P	Péptidos derivados de DVI y DVII	70.4	95.9	McCauley <i>et al.</i> , 2007
Inmunoensayo	MOMP de <i>C. trachomatis</i>	83	100	Forsbach-Birk <i>et al.</i> , 2010

Amplificación de ADN

La detección de *Chlamydia* spp. por PCR permite la identificación directa en muestras clínicas y la identificación a nivel de especies (Pospischil, 2006; Longbottom *et al.*, 2002). Estos métodos de PCR amplifican el operón de ARNr 16S (Meijer *et al.*, 1997; Everett *et al.*, 1999) o el gen *ompA* (Kaltenboeck *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998).

La PCR de punto final confirma la presencia o ausencia del patógeno, la detección y cuantificación de *C. abortus* es posible con base en *ompA* (Pantchev *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México, el AEPR está clasificado como una enfermedad endémica, sin embargo, su diagnóstico es limitado. Debido a la ausencia de pruebas serológicas elaboradas en el país que permitan un monitoreo constante de la clamidiosis caprina; es necesario desarrollar alternativas de diagnóstico locales. La obtención de una proteína recombinante (PR) para ser utilizada como antígeno, puede favorecer el desarrollo de métodos diagnósticos que permitan la identificación y control de la clamidiosis caprina que infecta rebaños nacionales.

3. HIPÓTESIS

Escherichia coli BL21 permitirá la expresión de la proteína OmpA de *C. abortus*.

4. OBJETIVO GENERAL

Expresar la proteína OmpA de *C. abortus* en *E. coli*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Amplificar el gen *ompA* de *C. abortus* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
2. Clonar el gen *ompA* de *C. abortus* en un vector de expresión
3. Identificar la expresión de la proteína OmpA por Western Blot

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de iniciadores para la amplificación del gen *ompA* de *C. abortus*

Se realizó el diseño de los iniciadores con base en la secuencia del gen *ompA* de *C. abortus* dentro del genoma de la cepa S26/3 disponible en el GenBank, con número de acceso CR848038.1 para amplificar un fragmento de 1101 pb que codifica la proteína OmpA de *C. abortus* madura (sin péptido señal) (Figura 4.a y b).

Los iniciadores fueron generados manualmente de acuerdo al *Manual de clonación y expresión de aLICator LIC* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). El extremo 5' del iniciador en sentido, Ca-*ompA*-F, incluye una secuencia específica del vector, señalada en color azul, seguido de un fragmento de 35 pb que corresponde al extremo 3' del gen de interés. Dentro de este fragmento, el codón de inicio está señalado en naranja lo que asegura que la secuencia específica del inserto esté en sentido. La temperatura de fusión de la sección de los iniciadores complementarios al gen de interés cumple con la restricción de ser de 60 °C o más. El iniciador anti-sentido, Ca-*ompA*-R, también tiene una secuencia complementaria específica del vector, señalada en color verde, al extremo 3' de la cadena pero sin incluir el codón de paro (Figura 4.b).

Los iniciadores fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología-UNAM. La homología entre estos y la secuencia del gen *ompA* de *C. abortus* cepa S26/3, fue verificada en la base de datos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). El tamaño del producto esperado de 1141 pb corresponde a 1101 de la secuencia de *ompA* sin péptido señal y 40 pb de ambos iniciadores.



b)

Ca-ompA-F:
 5'AGAAGGAGATATAACTATGTTGCCTGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGT
 TTATTAATCG-3'

Ca-ompA-R:
 5'GTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCGAATCTGAATTGAGCATTGATGTGAGCGG
 CTCTTTC-3'

Ca-ompA-F

AGAAGGAGATATAACTATGTTGG OCT GEA GGG AAC OCA GCT GAA OCA AGT TTA TTA ATC G
 5' →

1 TTGCCTGTAG GGAACCCAGC TGAACCAAGT TTATTAATCG ATGGCACTAT GTGGGAAGGT GCTTCAGGTG ATCCTTGCGA TCCTTGCTCT ACTTGGTGTG
 -1 Asp Ala Ile Ser Ile Arg Ala Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Val Phe Asp Arg Val Leu Lys Val Asp Val Asn Lys Thr Ile Thr Gly Met Gly Ala Val Pro
 101 ATGCTATCAG CATCCGCGCA GGATACTAGC GAGATTATGT TTTCGATCGT GTATTAAJAG TTGATGTGAA TAAACTATC ACCGGCATGG GTGCAGTTC
 -1 Pro Thr Gly Thr Ala Ala Ala Asn Tyr Lys Thr Pro Thr Asp Arg Pro Asn Ile Ala Tyr Gly Lys His Leu Gln Asp Ala Glu Tyr Phe Thr Asn Ala Ala
 201 TACAGGAACC GCAGCAGCTA ATTACAAAC TCTACGGAT AGACCCACCA TCGCTTACGG CAACACTTA CAAGACGCG AATGGTTCAC CAATGCAGCT
 -1 Phe Leu Ala Leu Asn Ile Top Asp Arg Phe Asp Ile Phe Cys Thr Leu Gly Ala Ser Asn Gly Tyr Phe Lys Ala Ser Ser Ala Ala Phe Asn Leu Val Gly
 301 TTCTCGCAT TGAATATCG GGATCGCTTT GATATTTCT GCACATTAGG CGTTCATAT GGGTACTTCA AAGCTAGTTC TGGGCATTC AACCTGGTGG
 BamHI
 -1 Gly Leu Ile Gly Val Lys Gly Ser Ser Ile Ala Ala Asp Gln Leu Pro Asn Val Gly Ile Thr Gln Gly Ile Val Glu Phe Tyr Thr Asp Thr Thr Phe Ser
 401 GTTGTATTGG TGTAAAGGA TCTCCATAG CAGCTGATCA GCTTCCCAAT GTAGGCATCA CTCAGGAAI CGTGTAAIT TATACAGATA CAACATTC
 -1 Ser Top Ser Val Gly Ala Arg Gly Ala Leu Top Glu Cys Gly Cys Ala Thr Leu Gly Ala Glu Phe Gln Tyr Ala Gln Ser Asn Pro Lys Ile Glu Met Leu
 501 TTGGAGTGTA GGTGCACGCG GAGCTTTATG GAGTGTGGT TGTGGACATT TAGGACGAGA GTTCCAAATC GCTCAGTCTA ATCCTAAAAT TGAATGTG
 -1 Asn Val Val Ser Ser Pro Ala Gln Phe Val Val His Lys Pro Arg Gly Tyr Lys Gly Thr Ala Phe Pro Leu Pro Leu Thr Ala Gly Thr Asp Gln Ala Thr
 601 AATGTAGTCT CCAGCCAGC ACAATTTGTG GTTCACAGC CTAGAGGATA CAAGGGNACA GCATTTCTCT TACCTCTAAC AGCTGGTACT GATCAGGCAA
 ClaI
 -1 Thr Asp Thr Lys Ser Ala Thr Ile Lys Tyr His Glu Top Gln Val Gly Leu Ala Leu Ser Tyr Arg Leu Asn Met Leu Val Pro Tyr Ile Ser Val Asn Top
 701 CTGCACATA GTGGCTACA ATTAAATACC ACGAATGGCA AGTGGTITA GCGCTCTCTT ATCGAATGAA CATGCTTGT CTTACATA GGTAAACTG
 -1 Top Ser Arg Ala Thr Phe Asp Ala Asp Ala Ile Arg Ile Ala Gln Pro Lys Leu Ala Ala Ala Val Leu Asn Leu Thr Thr Top Asn Pro Thr Leu Leu Gly
 801 GTCAGAGCA ACTTTTGATG CTGACGCTAT CCGCATCGCT CACCTAAAT TAGCTGCTGC TGTGTTAAC TTGACCATAT GGAACCCAAC CCTTTTGA
 -1 Glu Ala Thr Ala Leu Asp Thr Ser Asn Lys Phe Ala Asp Phe Leu Gln Ile Ala Ser Ile Gln Ile Asn Lys Met Lys Ser Arg Lys Ala Cys Gly Val Ala
 901 GAGCTACAG CTTTATATC TAGCAACAA TTGCTGACT TCTTSCAAAT TCGTTGATTT CAGATCAACA AAATGAAGTC TAGAAAAGCT TGTGGTGTAG
 -1 Ala Val Gly Ala Thr Leu Ile Asp Ala Asp Lys Top Ser Ile Thr Gly Glu Ala Arg Leu Ile Asn Glu Arg Ala Ala His Met Asn Ala Gln Phe Arg Phe
 1001 CTGTTGGTGC ACGTAAATC GAGCTGACA AATGGTCAI CACTGGTGA GCAAGCTTAA TCAATGAAG ASGCGCTCAC ATGAATGCTC AATTCAGATT
 -1 Phe
 1101 C GAA AGA GGC GCT CAC ATG AAT GCT CAA TTC AGA TT
 CAACGATGACATCACCAAGC **Ca-ompA-R(Complementario)**

Figura 4. Gen *ompA* de *C. abortus* cepa S26/3. a) Se señalan los sitios de restricción enzimática de *ClaI* y *BamHI* que se utilizaron para el análisis de la construcción. b) Se muestran las secuencias de los iniciadores y un fragmento de 1101 pb que codifica la proteína *OmpA* de *C. abortus* madura (sin péptido señal), se indica el iniciador *Ca-ompA-F* con una secuencia específica del vector (color azul), codón de inicio (color naranja); el iniciador *Ca-ompA-R* complementario con secuencia complementaria específica del vector (color verde).

Amplificación y purificación del gen *ompA* de *C. abortus*

Se estandarizó y optimizó una PCR para amplificar el gen *ompA*. Se utilizó como template ADN de *C. abortus* cepa NED14/0251-12, donado por la Universidad Complutense de Madrid, España.

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ L, con 5X Phusion HF Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Cada reacción contenía 25 pmol de cada iniciador Ca-*ompA*-F y Ca-*ompA*-R; 200 μ M dNTPs, 150 ng de ADN, 1 U Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), 3 % de dimetilsulfóxido (DMSO), cbp para 50 μ L de H₂O libre de nucleasas. Se empleó un termociclador Maxygene II (Axygen, NY, USA), con las condiciones de reacción siguientes: un ciclo a 98 °C por 30 s, 5 ciclos a 98 °C por 15 s, 42 °C por 10 s y 72 °C por 1 min; 30 ciclos de 98 °C por 10 s y 72°C por 1 min; y un último ciclo de 72 °C por 10 min. La visualización del producto amplificado por PCR se realizó mediante un gel de agarosa al 0.7% en amortiguador Tris-Acetato-EDTA (TAE), por electroforesis en una cámara horizontal, el gel fue teñido con bromuro de etidio y fotodocumentado en un equipo GEL Logic 2200 PRO Imaging System (Carestream Health, Inc, Woodbridge, USA).

Se realizó la purificación del producto de PCR mediante una columna Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research, California, EUA), bajo las condiciones del fabricante (Anexo I).

Clonación del gen *ompA* de *C. abortus*

El vector de expresión pLATE31 (Figura 5) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) es un vector para la clonación independiente de la ligación y permite la expresión bacteriana de la proteína etiquetada con 6xHis en el extremo C-terminal. Las condiciones para la clonación se realizaron de acuerdo al *Manual de clonación y expresión de aLICator LIC* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), y consistieron en un volumen final de 10 μ L con 5X LIC buffer, 88.5 ng del producto purificado de PCR, 1 U T4 DNA polimerasa y cbp para 10 μ L H₂O libre de nucleasas. La reacción se incubó por 5 min a temperatura ambiente; posteriormente se le agregó 0.6 μ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 60 ng del vector pLATE31, se incubó 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se

realizó la precipitación de la reacción de clonación y se agregó H₂O libre de nucleasas cbp para 20 µL de reacción de clonación, 1 µL de glicógeno, 2 µL de acetato de sodio y 50 µL de etanol al 100 %. Se incubó 1 h a -20°C y fue centrifugada a 16200 x g por 5 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70 %, la pastilla fue resuspendida en 10 µL de H₂O libre de nucleasas.

La reacción de clonación se usó para transformar por electroporación *E. coli* BL21. Se mezclaron 100 µL de *E. coli* BL21 y 3 µL de reacción de clonación, se incubaron en hielo por 10 min y se procedió a electroporar la mezcla con 1 pulso de 1.0 ms a 1800 V. Se agregó 1 mL de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron las células transformadas a 37 °C, con agitación a 200 rpm durante 1h. Finalmente, las células se sembraron en placas de agar LB-Ampicilina 100 µg/mL (Amp¹⁰⁰) y se incubaron a 37 °C toda la noche.

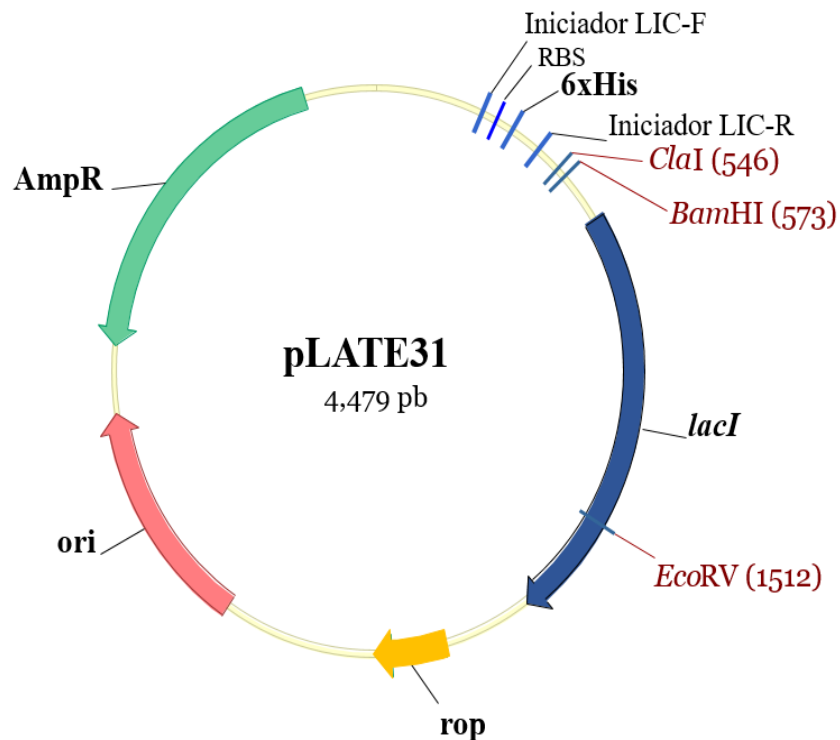


Figura 5. Vector de expresión pLATE31 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). RBS=Sitio de unión al ribosoma. 6xHis = Etiqueta de 6 histidinas. *lacI* = Represor lac para control de la expresión basal del promotor T7. *rop* = La proteína *rop* regula el número de copias del plásmido. *ori*= Origen de replicación. AmpR = Gen *bla* confiere resistencia a la ampicilina por β-lactamasas.

Análisis de la construcción por PCR

Con la finalidad de corroborar la presencia del inserto en las colonias transformadas, se realizó una PCR a partir de colonia con los iniciadores; LIC Forward (LIC-F): 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', y LIC Reverse (LIC-R): 5'-GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3', cuyos sitios de alineación se localizan en la secuencia del vector pLATE31 y generan un producto de 1346 pb, que corresponden a 205 pb que flanquean el inserto de 1141 pb.

Se utilizó como templete lisado bacteriano de las colonias transformantes seleccionadas. Brevemente, se tomó una asada de cada cultivo y se suspendió en 50 µL de H₂O. La lisis bacteriana se obtuvo por ebullición a 95 °C durante 10 min y se centrifugó a 16200 x g por 3 min.

La amplificación se realizó en un volumen final de 10 µL, se agregó 5µM de los iniciadores LIC-F y LIC-R, Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), que incluye *Taq DNA polymerase* 0.05 U/µL, 4 mM MgCl₂ y 0.4 mM de dNTP, 1 µL de lisado bacteriano y cbp H₂O libre de nucleasas.

El programa de amplificación consistió de una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C; 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 2 min; seguido de una extensión final a 72 °C por 5 min. La visualización del producto amplificado se realizó como se mencionó anteriormente.

Análisis de la construcción por restricción enzimática

Se analizó la construcción por restricción enzimática con las enzimas *EcoRV*, para la que existe un sitio de restricción en pLATE31; *BamHI*, la cual restringe en dos sitios: uno en el inserto y uno en pLATE31; y *ClaI*, para la que existe un sitio de restricción en el plásmido y dos sitios de restricción en el inserto. Las reacciones de restricción se realizaron como se describe a continuación.

Se seleccionaron 10 colonias, se sembraron en medio líquido LB-Amp¹⁰⁰ y se incubaron a 37 °C toda la noche. En seguida, se realizó la extracción del plásmido mediante lisis alcalina con la prueba AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, California, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Anexo II).

Las restricciones enzimáticas se llevaron a cabo en volúmenes de 20 μ L, con Buffer 10X, 1 U de cada enzima y 1 μ g de ADN plasmídico. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C, por 15 min para *EcoRV* y 1 h para *BamHI* y *ClaI*.

La visualización de los plásmidos digeridos se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio y fotodocumentado en un equipo GEL Logic 2200 PRO Imaging System (Carestream Health, Inc, Woodbridge, USA)

Secuenciación de la construcción

De forma paralela, el plásmido purificado fue secuenciado por el Instituto de Biotecnología-UNAM a partir de 700 ng de plásmido y los iniciadores LIC-F y LIC-R, anteriormente mencionados. El plásmido fue identificado como, pLATE/*ompACa*.

Expresión de la proteína OmpA recombinante

Se llevó a cabo la expresión de la PR de la siguiente forma: se cultivaron colonias de BL21-pLATE/*ompA* y BL21-pLATE31 (control vacío), en 10 mL de medio LB-Amp¹⁰⁰, se incubaron 18 h a 37 °C, con agitación a 200 rpm. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L del cultivo de 18 h, en 10 mL de medio LB-Amp¹⁰⁰, dilución 1:100. Se incubó por 3 h a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.6 que corresponde a la fase logarítmica.

Una vez alcanzada dicha densidad en el cultivo se tomó una alícuota de 1 mL, la cual se estableció como ‘fase cero’ en la curva de expresión. Posteriormente, el cultivo de BL21-pLATE/*ompA*, fue inducido con isopropil β -tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración final de 1 mM. Como control negativo se realizó cultivo de BL21-pLATE31 y BL21-pLATE/*ompACa* no inducido. Finalmente, los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación de 200 rpm durante 5 h y se tomaron alícuotas de 1 mL a las 3, 4 y 5 h posteriores a la inducción de cada cultivo. Las muestras fueron centrifugadas a 16200 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se conservó a -20 °C.

Para llevar a cabo la lisis de las células, se descongeló la pastilla y se resuspendió en 100 μ L de *B-PER II Bacterial Protein Extraction Reagent (2X)* (Thermo Scientific, Rockford, EUA), con 25 mg de Lisozima y 5 U de DNasa I.

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12 %, se realizó con 25 μ L de cada resuspensión y 5 μ L de buffer Laemmli 6X. Cada mezcla fue hervida por 5 min e inmediatamente se conservaron en hielo. Se cargaron dos geles en paralelo: Uno para ser teñido con Azul de Coomassie y otro para inmunotransferencia. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara vertical a 100 V durante 1 h 30 min.

Western blot

Para realizar la detección de la etiqueta de histidinas se realizó la técnica de Western blot. El gel de poliacrilamida fue transferido a una membrana de nitrocelulosa de la siguiente forma: El gel de poliacrilamida se incubó 15 min en buffer de transferencia (Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 10 %), y la membrana fue incubada en buffer de transferencia 5 min; la transferencia se realizó en cámara húmeda a 36 V y 260 mA, durante 18 h a 4 °C.

Para corroborar que la transferencia de proteínas se realizó una tinción rápida de la membrana con Rojo de Ponceau durante 3 min, posteriormente fue desteñida con agua destilada.

La membrana se incubó en TBS-T 1X (NaCl 150 mM, Tris HCl 100 mM, Tween 20 0.5 %) con caseína de Hammerstein al 1 %. Se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Este procedimiento bloquea los sitios de enlace inespecíficos de la membrana.

La membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal murino Anti-6xHis (Roche, Mannheim, Alemania) en dilución 1:1000, toda la noche en agitación a 4 °C. Se realizaron tres lavados de 5, 10 y 15 min en TBS-T 1X a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario HRP-anti-ratón 1:5000 (BioRad, Hercules, EUA), en TBS-T 1X con 5 % de leche descremada Svelty, en agitación a temperatura ambiente por 1 h. Nuevamente, se repitieron tres lavados con TBS-T 1X con las condiciones anteriores.

Se realizó detección quimioluminiscente con el sistema Inmun-Star HRP (BioRad, Hercules, EUA), se preparó una mezcla de sustrato luminol/enhancer y buffer peróxido en proporción 1:1. Se incubó la membrana en la mezcla de sustrato durante 1 min. Se colocó la membrana entre acetatos y se expuso en películas de rayos X (Kodak, New York, EUA) por 2 min.

Determinación de la solubilidad de la proteína recombinante

Se realizó el ensayo para determinar la solubilidad de la proteína expresada “Protocolo 6. Determinación de la solubilidad de la proteína marcada” (Qiagen, 2003). Una colonia de BL21-pLATE/*ompACa* fue incubada en 10 mL de medio LB-Amp¹⁰⁰, 18 h a 200 rpm y 37°C. Tras la incubación, fue subcultivada en dilución 1:100 y nuevamente incubada a 37°C, por 3 h a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm.

En este punto, previo a la inducción, se tomó 1 mL de muestra. Se obtuvo la pastilla por centrifugación a 16200 x g, se resuspendió en 50 µL de 1X Buffer Laemmli y se almacenó a -20 °C hasta su análisis por SDS-PAGE.

El cultivo fue inducido por IPTG a una concentración de 1 mM y permaneció en incubación por 5 h. Una vez transcurrido este tiempo, se colectó una segunda muestra (control inducido) de 1 mL, se obtuvo la pastilla por centrifugación a 16200 x g se resuspendió en 100 µL de 1X Buffer Laemmli y se almacenó a -20 °C hasta su análisis por SDS-PAGE. El resto del cultivo fue centrifugado a 4000 x g por 20 min. La pastilla fue resuspendida en 500 µL de Buffer de Lisis A, para purificación nativa (ANEXO III), se agregó lisozima a 1 mg/mL y se incubó en hielo por 30 min. La muestra fue sonicada con 6 pulsos a 300 W de 10 s alternados con pausas de 10 s, se centrifugó el lisado a 10000 x g a 4 °C por 30 min. Se decantó el sobrenadante (Extracto crudo A, proteína soluble) y se almacenó a 4 °C. La pastilla fue resuspendida en 500 µL de Buffer de Lisis C, que contiene la fracción insoluble (Extracto crudo B, proteína insoluble).

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de las muestras por SDS-PAGE. Se mezclaron 5 µL de Buffer Laemmli 2x con 5 µL de los extractos crudos A y B, se hirvieron junto con las muestras, no inducida e inducida a 95 °C por 5 min, e inmediatamente se pasaron a hielo. Se cargaron 20 µL de las muestras no inducida e inducida, y 10 µL de los extractos crudos para SDS-PAGE al 12 % por 1 h 30 min a 100 V, finalmente, se tiñó con Azul de Coomassie en agitación a temperatura ambiente por 18 h.

7. RESULTADOS

Amplificación del gen *ompA* de *C. abortus* por PCR

Se amplificó el fragmento de 1141 pb del gen *ompA* como se muestra en la figura 6, para su posterior purificación y clonación.

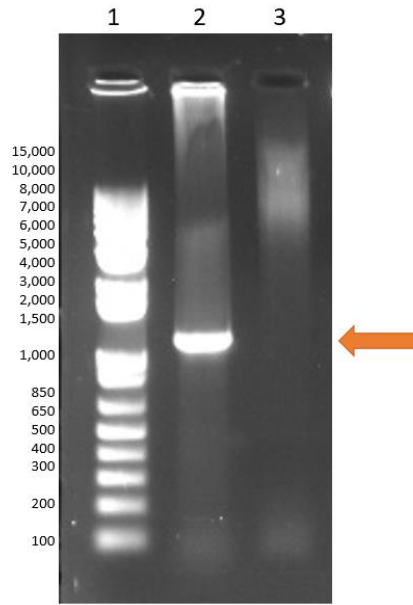


Figura 6. Amplificación de *ompA* de *C. abortus* por PCR. Carril 1. Marcador de Peso molecular *1 Kb plus DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Carril 2. Fragmento de 1141 pb del gen *ompA* de *C. abortus* (Flecha naranja) Carril 3. Control sin ADN.

Clonación del gen *ompA* de *C. abortus*.

Se presenta la construcción *in silico* del plásmido pLATE/*ompACa* basada en la secuencia de pLATE31, en la que se puede identificar el sitio de restricción de la enzima *EcoRV*, y los sitios dobles de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Cla*I, la posición del inserto de 1141 pb y la posición de la etiqueta de histidinas 6xHis (Figura 7). Con base en esta construcción *in silico* se procedió a realizar las restricciones.

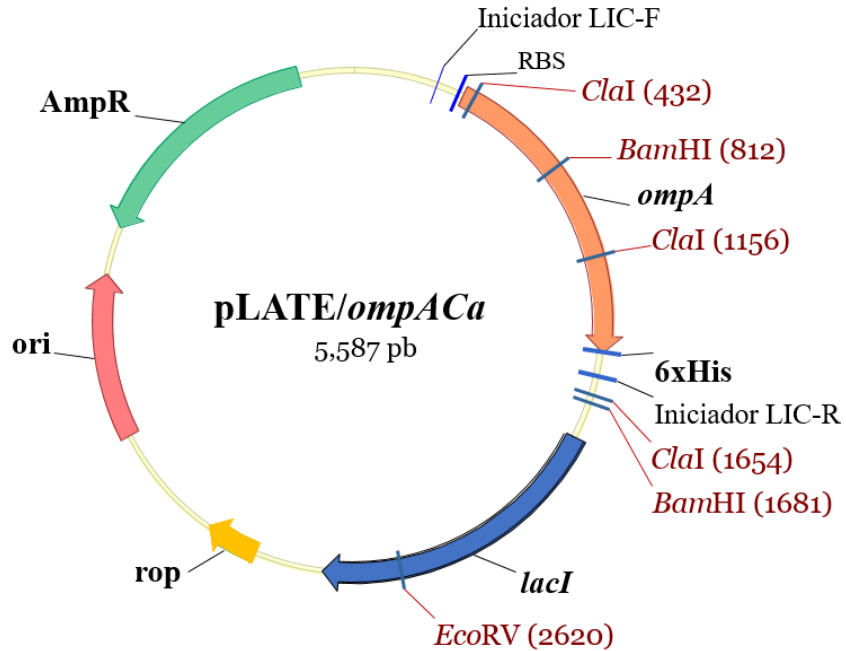


Figura 7. Construcción *in silico* pLATE/*ompACa*. La flecha naranja indica la posición del inserto de 1141pb.

Análisis de la construcción por PCR

Se realizó la PCR a partir de colonia única, con los iniciadores LIC-F y LIC-R (Figura 7). Se amplificó un producto de 1346 pb, que corresponde a un fragmento de 205 pb del vector y al inserto clonado de 1141 pb (Figura 8).

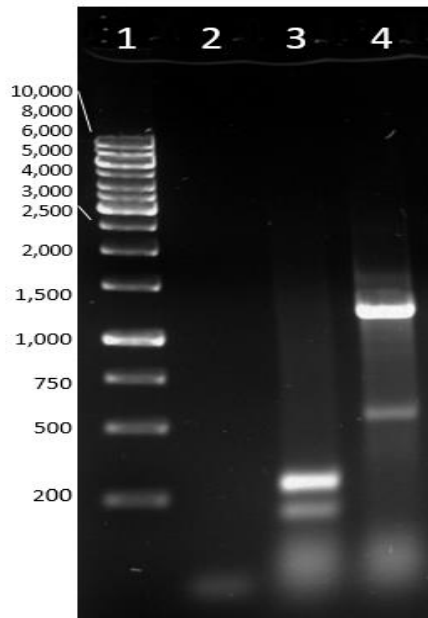


Figura 8. PCR de colonia. Carril 1. Marcador de Peso molecular *1 Kb DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Carril 2. Control sin ADN. Carril 3. Fragmento de 205 pb del vector pLATE31 vacío. Carril 4. Fragmento de 1346 pb de la construcción pLATE/*ompACa*.

Análisis de la construcción por restricción enzimática

Mediante restricción enzimática del plásmido pLATE31 con *EcoRV*, *BamHI* y *ClaI* se observó el plásmido linealizado, con un peso de 4479 pb. La restricción enzimática del plásmido pLATE/*ompACa* con *EcoRV* en un solo sitio de corte resultó en el plásmido linealizado con peso molecular de 5587 pb. La restricción del plásmido con la enzima *BamHI*, la cual tiene dos sitios de corte, generó dos productos: 4718 pb y 869 pb. La restricción del plásmido con la enzima *ClaI*, generó tres productos: 4365 pb, 724 pb y 498 pb (Figura 9).

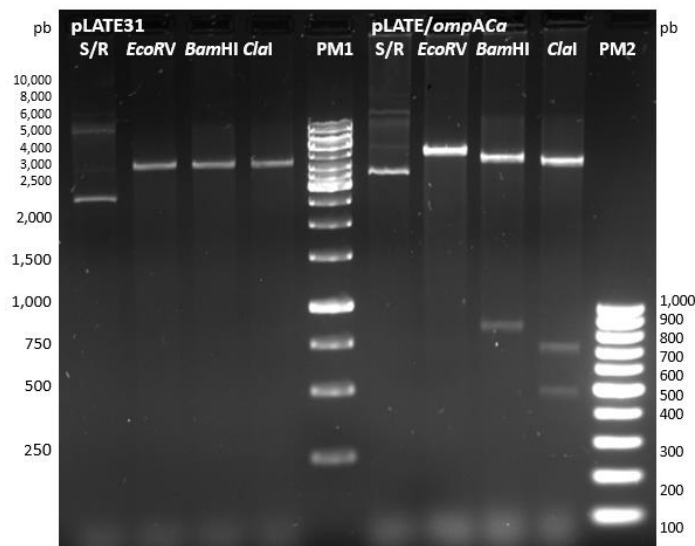


Figura 9. Restricción enzimática en gel de agarosa al 1% de la construcción pLATE/*ompACa*. Carril 1. pLATE31 S/R. Carril 2. pLATE31 + *EcoRV*: fragmento de 4479 pb. Carril 3. pLATE31 + *BamHI*: fragmento de 4479 pb. Carril 4. pLATE31 + *ClaI*: fragmento de 4479 pb. Carril 5. *1 Kb DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Carril 6. pLATE/*ompACa* S/R. Carril 7. pLATE/*ompACa* + *EcoRV*: fragmento de 5587 pb. Carril 8. pLATE/*ompACa* + *BamHI*: fragmentos de 4718 pb y 869 pb. Carril 9. pLATE/*ompA* + *ClaI*: fragmentos de 4365 pb, 724 pb y 498 pb. Carril 10. *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Cada carril corresponde a la restricción enzimática de 1000 ng de cada plásmido; S/R: Sin restricción.

Secuenciación de la construcción

Se llevó a cabo el análisis de la secuencia recibida del IBT, por medio del programa computacional BioEdit. Se realizó un análisis visual de los cromatogramas para diferenciar picos únicos y separados, de aquellos que se sobreponían y se editaron los errores de lectura. Posteriormente, se alinearon las secuencias del vector pLATE31 con las secuencias de pLATE/*ompACa* y los iniciadores LIC-F y LIC-R en el programa Vector NTI. Como se presenta en la figura 10, la construcción se encuentra en sentido, en fase correcta y presenta la etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal (Figura 10).

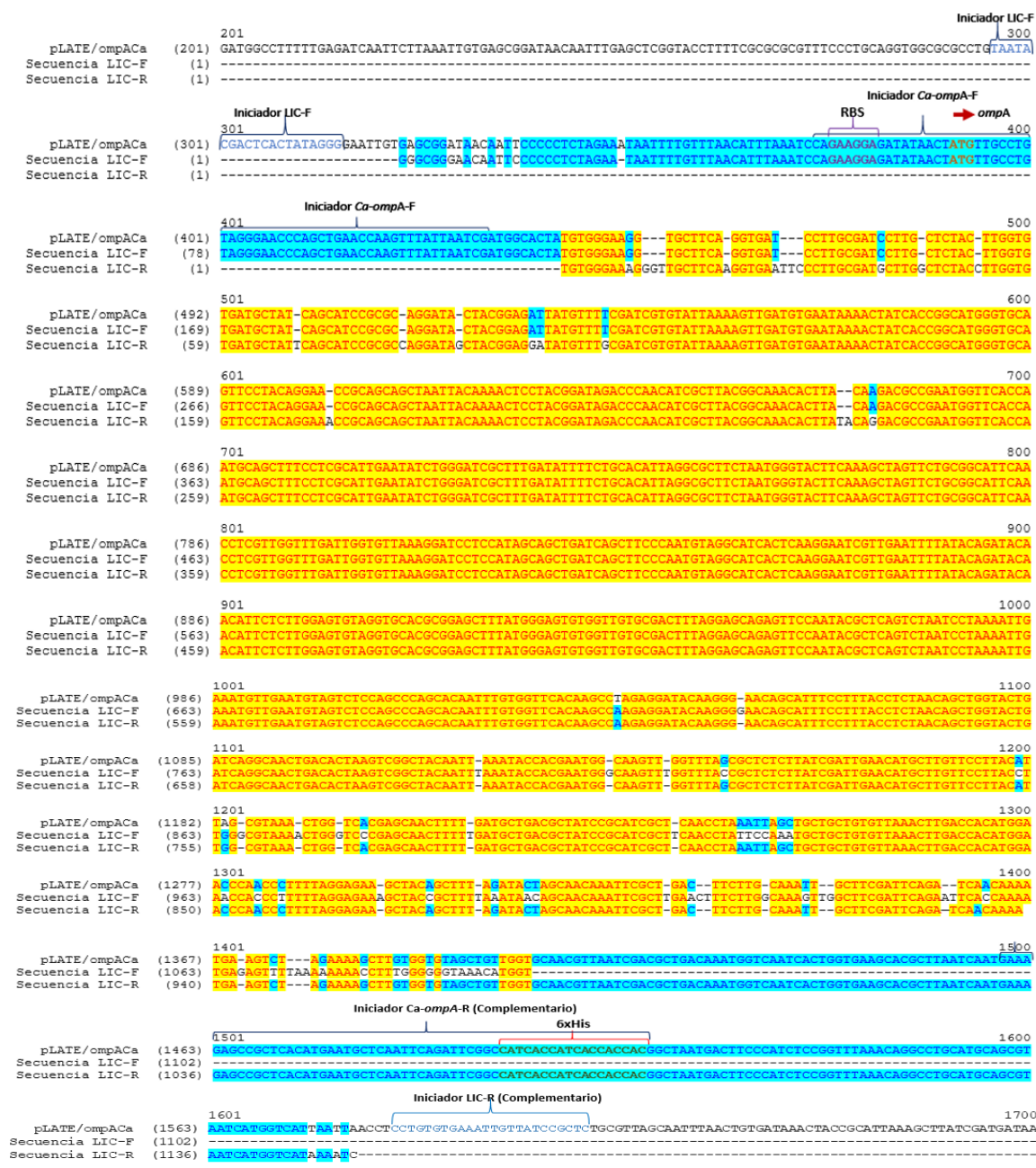


Figura 10. Alineamiento de secuencias. Alineamiento de las secuencias del plásmido pLATE31 y las secuencias de la construcción pLATE/*ompAca* en sentido con el iniciador LIC-F (Secuencia LIC-F) y con el iniciador en antisentido (Secuencia LIC-R), sin gaps. En el alineamiento se resaltan en amarillo las posiciones homólogas en las tres secuencias y en azul las posiciones homólogas en dos secuencias. El corchete azul identifica los sitios de alineación de los iniciadores *Ca-ompA-R* y *Ca-ompA-F* empleados para la amplificación de *ompA*, el sitio de unión a ribosomas (RBS) y los iniciadores LIC-F y LIC-R. El corchete rojo identifica la posición de los seis residuos de histidina y la flecha roja, la posición 1 de inicio de transcripción.

Expresión de la proteína OmpA recombinante

En la figura 11 se observa la sobre-expresión de OmpA recombinante de ~38 kDa a las 3, 4 y 5 h posteriores a la inducción con 1 mM de IPTG. El peso molecular estimado de ~38 kDa corresponde a la ausencia del péptido señal de 22 aminoácidos, el cual fue omitido en la construcción del plásmido pLATE/*ompACa*.

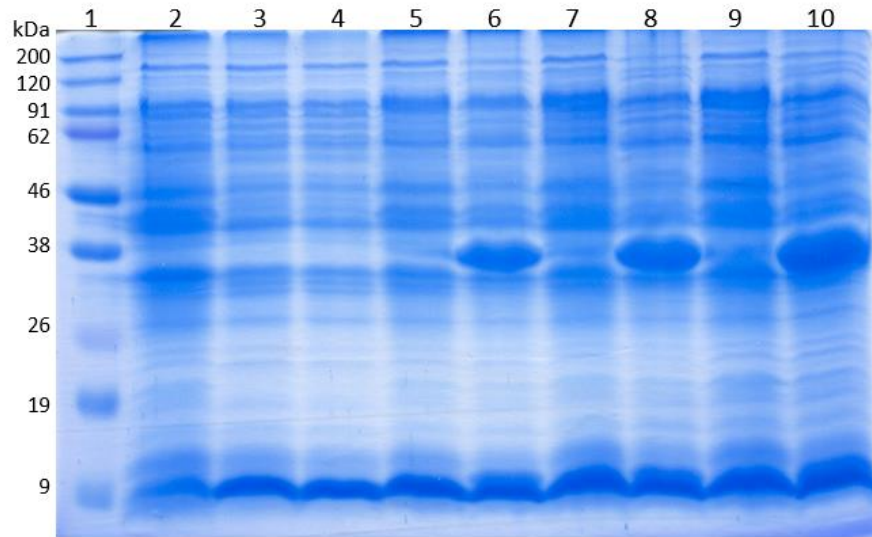


Figura 11. Inducción de *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa*. Carril 1. *BlueStep*TM *Broad Range Protein Marker* Carril 2. *E. coli* BL21-pLATE31. Carriles 3, 5, 7 y 9. *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* sin inducción, a las 0, 3, 4 y 5 h, respectivamente. Carriles 4, 6, 8 y 10. *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* inducida con 1 mM de IPTG, a las 0, 3, 4 y 5 h post-inducción, respectivamente. En los carriles 6, 8 y 10, se observa la banda de ~38 kDa, que corresponde a la sobreexpresión de OmpA recombinante.

Western blot

La proteína de ~38 kDa se identificó por *Western blot*, con un anticuerpo monoclonal murino Anti-6xHis (Roche, Mannheim, Alemania), posteriormente revelado con el anticuerpo secundario anti-ratón-HRP (BioRad, Hercules, EUA) y revelado a los 2 min de exposición de la placa radiográfica (Figura 12).

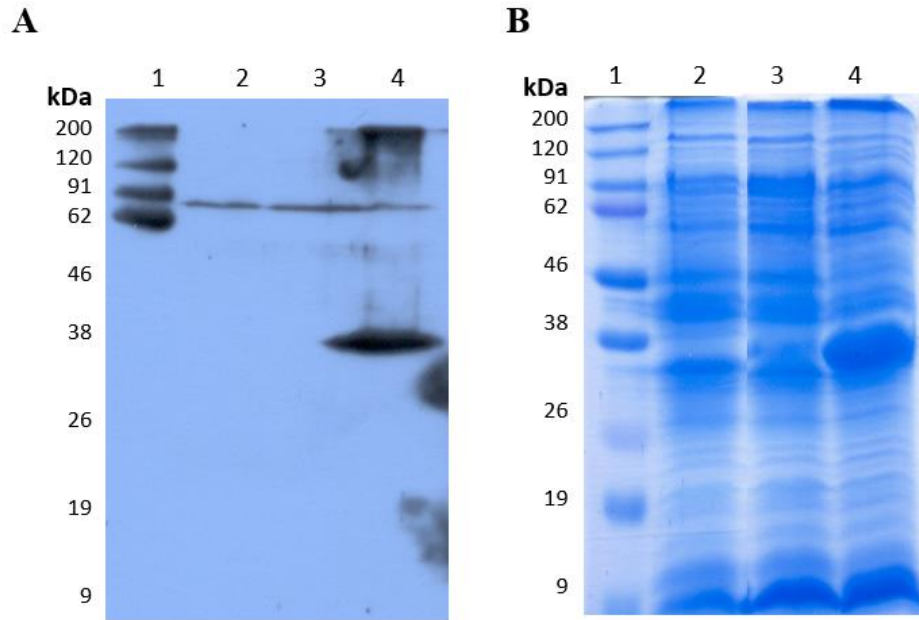


Figura 12. Western blot con anti-6xHis. **A.** Membrana PVDF expuesta al anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal murino Anti-6xHis (Roche, Mannheim, Alemania) y anticuerpo secundario: Anti-ratón-HRP, con exposición de 2 min. Carril 1. *BlueStepTM Broad Range Protein Marker* (Amresco, Cleveland, EUA). Carril 2. *E. coli* BL21-pLATE31. Carril 3. *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* sin inducción. Carril 4. *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* inducida con 1 mM de IPTG a las 5 h post-inducción, banda de ~38 kDa. **B.** Gel de poliacrilamida al 12 %, teñido con Azul de Coomassie. Carril 1. *BlueStepTM Broad Range Protein Marker* (Amresco, Cleveland, EUA). Carril 2. *E. coli* BL21-pLATE31. Carril 3. *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* sin inducción. Carril 4. *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* inducida con 1 mM de IPTG a las 5 h post-inducción, banda de ~38 kDa.

Determinación de la solubilidad de la proteína recombinante

Se observó la presencia de la PR en la fracción insoluble de *E. coli*, como se observa en la figura 13.

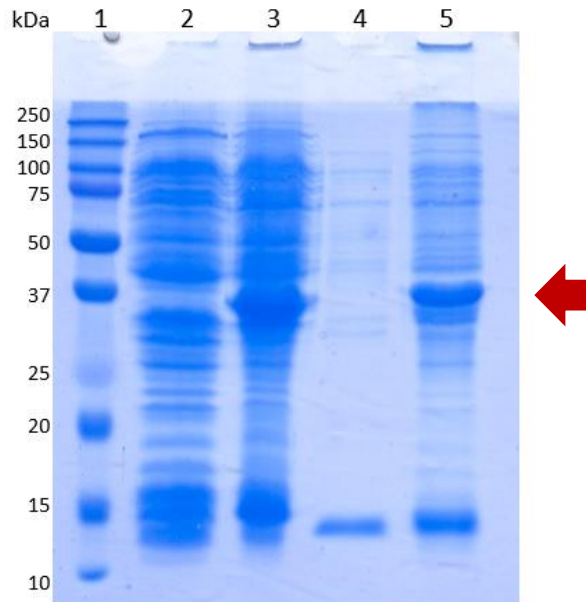


Figura 13. Determinación de la solubilidad de la proteína. Carril 1. Marcador de Peso Molecular *Precision Plus ProteinTM Standards Dual Color* (BioRad, Hercules, EUA). Carril 2. Extracto total de *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa*. Carril 3. Extracto total de *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* inducida con 1 mM de IPTG, 5 h post-inducción. Carril 4. Fracción soluble de *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* inducida con 1 mM de IPTG, 5 h post-inducción. Carril 5. Fracción insoluble, de *E. coli* BL21-pLATE/*ompACa* inducida con 1 mM de IPTG, 5 h post-inducción. La flecha roja indica la banda de ~38 kDa que corresponde a OmpA.

8. DISCUSIÓN

A partir del 2010, el CENID-Microbiología Animal del INIFAP y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México se han dado a la tarea de investigar el AEPR en México, por medio de aislamiento bacteriano, PCR y pruebas serológicas (Arellano, 2015; Mora-Díaz, 2011; Sánchez, 2014). Cabe mencionar que las técnicas serológicas disponibles comercialmente son limitadas y no están disponibles en el país, por lo cual, su adquisición es costosa y tardada. Con anterioridad se realizó un ELISA en el país, en el que se utilizaron CE como antígeno, con 66.6 % de especificidad y 75 % de sensibilidad (Martínez, 2013). Este trabajo es el antecedente para enfocar esfuerzos hacia la habilitación de pruebas más fiables basadas en un antígeno específico.

La superficie de la membrana externa de *Chlamydia* es el sitio de interacción entre la bacteria y la célula hospedera. En esta interacción intervienen proteínas de membrana, y a partir del análisis de las proteínas expuestas en su superficie durante el proceso de infección (Jones *et al.*, 2000), se identificó que la proteína OmpA representa el 60 % de estas proteínas expuestas en la superficie de los miembros del género *Chlamydia* (Baehr *et al.*, 1988). OmpA es expresada durante todo el ciclo de desarrollo de la bacteria, está formada por 4 dominios expuestos superficialmente, altamente variables (segmentos variables, VS1 a VS4) dispersos entre 5 segmentos transmembranales altamente conservados (CS1 a CS5) (Stephens *et al.*, 1987). Funcionalmente, OmpA es una adhesina que permite la unión a la superficie de la célula hospedera (Su *et al.*, 1990) y es una porina que permite la difusión de pequeñas moléculas (Bavoil *et al.*, 1984). Además, posee epítomos sero-específicos que provocan la respuesta de células T y anticuerpos neutralizantes (Su y Caldwell, 1991; Hagemann *et al.*, 2016).

Debido a su exposición en la superficie, su alta inmunogenicidad y su papel en la interacción entre la bacteria y la célula hospedera, OmpA fue seleccionada como “antígeno diana” para pruebas serológicas (Salti-Montesanto *et al.*, 1997; Vretou *et al.*, 2007; McCauley *et al.*, 2007; Forsbach-Birk *et al.*, 2010), pruebas moleculares (Kaltenboeck *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998; Pantchev *et al.*, 2010) y desarrollo de vacunas (Dong-Ji *et al.*, 2000; Pal *et al.*, 2001). Por las razones antes descritas, OmpA es un buen “antígeno diana” y en este trabajo se amplificó y clonó el gen *ompA* de *C. abortus*, para expresar esta proteína recombinante

(rOmpA) en *E. coli*, con la finalidad de obtener este antígeno para el desarrollo de pruebas con esta porina.

A través de pruebas ELISA se han evaluado sueros de animales infectados natural y experimentalmente con rOmpA de *C. abortus*. En el estudio realizado por Hagemann *et al.*, 2016, observaron una fuerte respuesta humoral contra rOmpA, desde la segunda semana post-infección hasta 47 semanas después de la infección; además, no observaron reacción cruzada con sueros de animales positivos por PCR a *C. pecorum* y *C. psittaci*, ni falsos positivos con animales negativos por PCR a *C. abortus* (Hagemann *et al.*, 2016). Por otra parte, Forsbach-Birk *et al.*, 2010 desarrollaron un ELISA con rOmpA de *C. trachomatis*, con sensibilidad de 83 % y especificidad de 100 % (Forsbach-Birk *et al.*, 2010).

OmpA es particularmente difícil de purificar y reconstituir debido a la presencia de enlaces disulfuro que posee la membrana externa de *Chlamydia*, y del COMC insoluble en detergente iónico (Hatch *et al.*, 1984) Se ha identificado que OmpA de *C. trachomatis* posee ocho residuos de cisteínas conservadas, encontrados en las posiciones 48, 51, 55, 136, 201, 203, 226 y 351, cuatro de estas cisteínas están involucradas en enlaces disulfuro intramoleculares, formados entre Cys48 y Cys55, y entre Cys201 y Cys203. Los otros residuos Cys51, Cys136, Cys226 y Cys351, son cisteínas libres y podrían potencialmente formar complejos unidos por enlaces disulfuro con otras OmpA o las otras proteínas del COMC, OmcA y OmcB (Yen *et al.*, 2005). Los estudios estructurales de OmpA se han visto obstaculizados por el hecho de que en condiciones nativas la solubilidad de esta proteína es baja, lo que dificultó su purificación (Wang *et al.*, 2006).

El sistema de expresión basado en *E. coli*, una bacteria Gram-negativa ampliamente usada para la producción de proteínas recombinantes, presenta una serie de ventajas importantes: i) su genoma es conocido desde hace varios años, lo que amplía considerablemente las posibilidades de su manipulación genética, ii) existe una base teórica acumulada sobre su fisiología y metabolismo, iii) se dispone de vectores establecidos para la producción de proteínas recombinantes, y iv) tiene rápido crecimiento en medios simples, con altos niveles de producción de proteínas recombinantes producidas rutinariamente con rendimientos en la escala de g/L (Georgiou y Segatori, 2005; Demain y Vaishnav, 2009).

En algunos casos, la expresión de una proteína recombinante funcional puede ser perjudicial para la proliferación y diferenciación de la célula hospedera, y altera la homeostasis del microorganismo. El resultado visible es una tasa de crecimiento lenta, baja densidad celular y la inducción de la muerte, esto es conocido como efecto tóxico. (Doherty *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1995). Como primera medida, el crecimiento celular debe monitorizarse antes de la inducción. Si la tasa de crecimiento de la cepa recombinante es más lenta en comparación con una cepa portadora de vectores vacíos, dos causas explican esta observación: la toxicidad de los genes y la expresión basal del ARNm (Saïda *et al.*, 2006). Si el cultivo crece bien hasta el momento de la inducción, o si posterior a la inducción, el crecimiento celular se ve mermado, entonces se debe a que la proteína es tóxica (Rosano y Ceccarelli, 2014). En específico, la expresión de rOmpA en *E. coli* ha sido descrita por varios grupos (Koehler *et al.*, 1992; Hoelzle *et al.*, 2003; Findlay *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de los estudios se refieren a especies de *Chlamydia* de importancia clínica humana como *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Hoelzle y colaboradores expresaron OmpA de especies de interés veterinario, como lo son *C. abortus*, *C. pecorum* y *C. suis* (Hoelzle *et al.* 2003). Koehler *et al.* 1992, clonaron en el vector pET11d, el gen *ompA* de longitud completa, que incluye la secuencia de péptido señal para dirigir la proteína traducida a la membrana externa, y demostraron la expresión de OmpA en la superficie de membrana de *E. coli* BL21 (DE3) (Koehler *et al.*, 1992). Ellos observaron una reducción en la viabilidad celular de *E. coli* por lisis celular. De la misma forma, Hoelzle *et al.* 2003, clonaron *ompA* en el vector pBADMycHis-inducible por arabinosa- en secuencia completa y carente del péptido señal N-terminal de 22 aminoácidos. El gen *ompA* de secuencia completa, expresó la proteína en la membrana externa de *E. coli* LMG194 con viabilidad celular reducida, en contraste con rOmpA carente del péptido señal, que se expresó como cuerpos de inclusión citoplásmicos insolubles donde no se afectó la viabilidad celular. La viabilidad reducida en ambos trabajos se explica por el procesamiento y traslocación post-traducciona l de OmpA de longitud completa a la membrana externa de *E. coli*, lo que conduce a la aparición de cambios en la membrana externa y al aumento de la fragilidad de la célula bacteriana (Koehler *et al.*, 1992). Debido a las anteriores observaciones, en el presente trabajo se eligió clonar la secuencia de *ompA* carente de péptido señal, y expresarlo en el vector pLATE31 inducible por IPTG. El

vector pLATE31 no presenta expresión basal de la proteína, lo que disminuye los posibles efectos citotóxicos que afectan la viabilidad celular antes mencionada (Pickett *et al.*, 1988; Koehler *et al.*, 1992; Hoelzle *et al.*, 2003). Las características que le permiten al vector pLATE31 reducir la expresión basal de T7 ARN polimerasa son: dos operadores *lac* que flanquean el promotor T7 y sirven como sitios de unión para el represor *lac* (codificado por el gen *lacI*) y un terminador rrnBT1-T2 que se coloca “*upstream*” del sitio de clonación para evitar la expresión génica basal de elementos similares a promotores. Además un promotor Tet débil inducido constitutivamente (P_{tet}) opera en la dirección opuesta al promotor T7, lo que suprime en su totalidad la expresión basal.

rOmpA fue visualizada en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), en el cual se observó una banda de 38 kDa sobre-expresada, desde las 3 h hasta las 5 h post-inducción con 1 mM de IPTG. Esta disminución en el peso molecular de OmpA corresponde a la eliminación del péptido señal N-terminal de 22 aminoácidos que tiene un peso aproximado de 2.7 kDa (Kaul *et al.*, 1990).

En pLATE31, el gen de interés se clonó con un péptido de fusión C-terminal que contiene una etiqueta 6xHis. La presencia de esta etiqueta fusionada a rOmpA fue confirmada por *Western blot*, donde se observó la banda de ~38 kDa a las 5 h post-inducción con 1 mM de IPTG.

Para el proceso de purificación, se requiere la identificación de la fracción en la cual se encuentra la PR de interés. La ventaja de la expresión de PR como cuerpos de inclusión insolubles, es que estos están en gran parte protegidos de la degradación por proteasas altamente concentradas en el ambiente intracelular, que pudieran alterar algunas características de la PR. Cabe mencionar que la cepa *E. coli* BL21(DE3) no contiene la proteasa lon, y es deficiente en la proteasa de la membrana externa OmpT, la falta de estas dos proteasas reduce la degradación de PRs expresadas en esta cepa bacteriana (Yin *et al.*, 2007). Además, las proteínas expresadas como cuerpos de inclusión insolubles, permiten una purificación sencilla por medio de cromatografía de afinidad, entre Ni-NTA y la etiqueta 6xHis (Crowe *et al.*, 1994; Hoelzle *et al.*, 2003). Este es el caso de rOmpA expresada en este trabajo que se localizó en la fracción insoluble de *E. coli* (Figura 13).

La desventaja que se presenta con la expresión de proteínas insolubles en cuerpos de inclusión, es que esta debe recuperarse mediante procesos de desnaturalización (Clark, 1998; Marston, 1986) y posteriormente se induce su replegamiento por otros métodos que incluyen dilución, diálisis, filtración en gel o la inmovilización en un soporte sólido, para eliminar o reducir el exceso de agentes desnaturalizantes y reductores, permitiendo que las proteínas se renaturalicen (Wingfield *et al.*, 2003; Clark, 1998). No obstante, la obtención de rOmpA de la fracción insoluble, nos permitirá en un futuro mimetizar la conformación nativa para generar una mayor respuesta inmunológica como lo describió Wen *et al.*, 2016 (Wen *et al.*, 2016).

Por último, OmpA de *C. trachomatis* está N-glicosilada y contiene oligosacáridos con alto contenido de manosa (Kuo *et al.*, 1996), y estos residuos de manosa median su adhesión, internalización e infectividad, en macrófagos de ratón (Kuo *et al.*, 2002) Hasta el momento no se conoce si OmpA de *C. abortus* está glicosilada. Sin embargo, debido a la importancia de un correcto plegamiento de la proteína recombinante, la desventaja de que la producción de PR en *E. coli*, una bacteria incapaz de hacer modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación (Lara, 2011) eventualmente nos llevará a evaluar el impacto del empleo de este modelo de expresión en rOmpA.

9. CONCLUSIONES

E. coli BL21 (DE3) es capaz de permitir la expresión de rOmpA en abundancia a partir de la amplificación del gen *ompA* de *C. abortus* NED14/0251-12, sin la secuencia de péptido señal, y clonado en el vector pLATE31 bajo inducción de IPTG a concentración de 1 mM por 3, 4 y 5 h post-inducción, en su fracción insoluble.

La expresión de rOmpA abre paso para el desarrollo de pruebas diagnósticas locales que permitirán la identificación y control de la clamidiosis caprina que infecta a los rebaños nacionales.

10. PERSPECTIVAS

La construcción obtenida en *E. coli* BL21(DE3), permitirá la obtención abundante de rOmpA de *C. abortus*, que será purificada para emplearse como antígeno en pruebas diagnósticas.

La purificación de la rOmpA se podrá llevar a cabo por medio de cromatografía de afinidad de Ni-NTA para la etiqueta de histidinas fusionada en la porción C-terminal de la proteína expresada. Se llevará a cabo la renaturalización de la proteína en su conformación nativa.

11. FUENTES DE CONSULTA

1. Abdelrahman YM, Belland RJ. The chlamydial developmental cycle FEMS Microbiol Rev 2005;29(5):949-959.
2. Aitken ID, Longbottom D. Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). En: OIE Biological Standards Commission (Eds.), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). 2004 Office International des Epizooties, Paris, pp. 635–641.
3. Alonso R, Galán JC, Gutiérrez-Fernández J, Rodríguez-Domínguez M, Salinas J, Sanbonmatsu Gámez S. Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. 2ª ed. Madrid (España): Seimc; 2012.
4. Andersen AA, Vanrompay D. Avian chlamydiosis. Rev Sci Tech. 2000;19(2):396-404.
5. Aniento F, Emans N, Griffiths G, Gruenberg J. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. J Cell Biol. 1993;123(6):1373-1387.
6. Appleyard WT, Aitken ID, Anderson IE. Attempted venereal transmission of *Chlamydia psittaci* in sheep. Vet Rec. 1985;116(20):535–538.
7. Arellano RB. Clamidiasis. En: Díaz AE, Tórtora PJL, Palomares REG, Gutiérrez HJL. Enfermedades de las cabras. Libro Científico 1. 2015. México p277-286.
8. Arens M, Weingarten M. Vergleichende Untersuchungen an Buffalo Green monkey (BGM) Zellen und Mäusen zur Isolierung von *Chlamydia psittaci* aus Kot und Organproben von Vögeln. Zentralbl Veterinar med B. 1981;28(4):301–309.
9. Baehr W, Zhang YX, Joseph T, Su H, Nano FE, Everett KD, Caldwell HD. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(11):4000-4004.
10. Barbour AG, Amano K, Hackstadt T, Perry L, Caldwell HD. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. J Bacteriol. 1982;151(1):420–428.
11. Bavoi P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun. 1984;44(2):479-485.
12. Beeckman DS, De Puyseleer L, De Puyseleer K, Vanrompay D. Chlamydial biology and its associated virulence blockers. Crit Rev Microbiol. 2014;40(4):313-328.
13. Betts-Hampikian HJ, Fields KA. The chlamydial type III secretion mechanism: revealing cracks in a tough nut. Front Microbiol. 2010;1:114.
14. Brade H, Rietschel ET. α -2 \rightarrow 4-Interlinked 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid disaccharide: A common constituent of enterobacterial lipopolysaccharides. Eur J Biochem. 1984;145(2):231-236.
15. Buchholz KR, Stephens RS. Activation of the host cell proinflammatory interleukin-8 response by *Chlamydia trachomatis*. Cell Microbiol. 2006;8(11):1768–1779.
16. Buendía AJ, Cuello F, Del Río L, Gallego MC, Caro MR, Salinas J. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. Vet Microbiol. 2001;78(3):229-239.
17. Buendía AJ, Martínez CM, Ortega N, Del Río L, Caro MR, Gallego MC, Sánchez J, Navarro JA, Cuello F, Salinas J. Natural killer (NK) cells play a critical role in the early

- innate immune response to *Chlamydomyphila abortus* infection in mice. J Comp Pathol. 2004;130(1):48-57.
18. Buxton D, Barlow RM, Finlayson J, Anderson IE, Mackellar A. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. J Comp Pathol. 1990;102(2):221-237.
 19. Buxton D. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. Vet Rec. 1986;118(18):510–511.
 20. Byrne GI, Ojcius DM. *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. Nat Rev Microbiol. 2004;2(10):802–808.
 21. Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun. 1981;31(3):1161–1176.
 22. Campos-Hernández E, Vázquez-Chagoyán JC, Salem AZ, Saltijeral-Oaxaca JA, Escalante-Ochoa C, López-Heydeck SM, de Oca-Jiménez RM. Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. Trop Anim Health Prod. 2014;46(6):919-924.
 23. Caro MR, Buendía AJ, Del Río L, Ortega N, Gallego MC, Cuello F, Navarro JA, Sanchez J, Salinas J. *Chlamydomyphila abortus* infection in the mouse: a useful model of the ovine disease. Vet Microbiol. 2009;135(1-2):103-111.
 24. Clague MJ, Urbé S, Aniento F, Gruenberg J. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. J Biol Chem. 1994;269(1):21-24.
 25. Clark EDB. Refolding of recombinant proteins. Curr Opin Biotechnol. 1998;9(2):157–163.
 26. Clifton DR, Dooley CA, Grieshaber SS, Carabeo RA, Fields KA, Hackstadt T. Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. Infect Immun. 2005;73(7):3860–3868.
 27. Costerton JW, Poffenroth L, Wilt JC, Kordová N. Ultrastructural studies of the nucleoids of the pleomorphic forms of *Chlamydia psittaci* 6BC: a comparison with bacteria. Can J Microbiol. 1976;22(1):16–28.
 28. Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. Immunol Rev. 2005;207(1):145–157.
 29. Cross RF, Clafin RM. The incidence and removal of procomplementary activity in swine serum. Am J Vet Res. 1963;24(1):334–336.
 30. Crowe J, Döbeli H, Gentz R, Hochuli E, Stüber D, Henco K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. Methods Mol Biol. 1994;31:371-387.
 31. Darville T, O’Connell CM. *Chlamydia* immunopathogenesis En: Tan M, Bavoil PM, editores. Intracellular Pathogens 1: Chlamydiales Vol. 1. USA: ASM press; 2012 p [240-264].
 32. Del Río L, Buendía AJ, Sánchez J, Gallego MC, Caro MR, Ortega N, Seva J, Pallarés FJ, Cuello F, Salinas J. Endogenous Interleukin-12 is not required for resolution of *Chlamydomyphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection in mice. Infect Immun. 2001;69(8):4808-4815.

33. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 2009;27(3):297-306.
34. Di Francesco A, Donati M, Rossi M, Pignanelli S, Shurdhi A, Baldelli R, Cevenini R. Tetracycline-resistant *Chlamydia suis* isolates in Italy. *Vet Rec.* 2008;163(8):251–252.
35. Diario Oficial de la Federación 29 de noviembre de 2018 Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
36. Diario Oficial de la Federación 5 de marzo de 1999 Acuerdo mediante el cual se enlistan las plagas y enfermedades exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
37. Doherty AJ, Connolly BA, Worrall AF. Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene* 1993;136(1-2):337–340.
38. Dong H, Nilsson L, Kurland CG. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol* 1995;177(6):1497–1504.
39. Dong-Ji Z, Yang X, Shen C, Lu H, Murdin A, Brunham RC. Priming with *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein (MOMP) DNA followed by MOMP ISCOM boosting enhances protection and is associated with increased immunoglobulin A and Th 1 cellular immune responses. *Infect Immun.* 2000;68(6):3074-3078.
40. Dugan J, Andersen AA, Rockey DD. Functional characterization of IScs605, an insertion element carried by tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Microbiology.* 2007;153(1), 71–79.
41. Dugan J, Rockey DD, Jones L, Andersen AA. Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial *inv*-like gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10),3989–3995.
42. Elwell C, Mirrashidi K, Engel J. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(6),385-400.
43. Escalante-Ochoa C, Díaz-Aparicio E, Segundo-Zaragoza C, Suárez-Güemes F. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in México: first report. *Rev Latinoam Microbiol.* 1997;39(3-4):117-121.
44. Escalante-Ochoa C, Ducatelle R, Haesebrouck F. The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell? *FEMS Microbiol Rev.* 1998;22(2):65-78.
45. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49(2):415–440.
46. Everett KD, Hatch TP. Sequence analysis and lipid modification of the cysteine-rich envelope proteins of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol.* 1991;173(12):3821–3830.

47. Feher VA, Randall A, Baldi P, Bush RM, de la Maza LM, Amaro RE. A 3-Dimensional trimeric β -barrel model for *Chlamydia* MOMP contains conserved and novel elements of Gram-negative bacterial porins. PLoS ONE. 2013;8(7): e68934.
48. Fields KA. Protein secretion and *Chlamydia* pathogenesis. En: Tan M, Bavoil PM, editores. Intracellular Pathogens 1: Chlamydiales Vol. 1. USA: ASM press; 2012 p.[192–216].
49. Findlay HE, McClafferty H, Ashley RH. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. BMC Microbiol. 2005;5(5):1-15.
50. Forsbach-Birk V, Simnacher U, Pfrepper KI, Soutschek E, Kiselev AO, Lampe MF, Meyer T, Straube E, Essig A. Identification and evaluation of a combination of chlamydial antigens to support the diagnosis of severe and invasive *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Infect 2010;16(8):1237–1244.
51. Fox A, Rogers JC, Gilbert J, Morgan S, Davis CH, Knight S, Wyrick PB. Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry Infect Immun. 1990;58(3):835-7.
52. Fukushi H, Hirai K. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. Int J Syst Bacteriol. 1992;42(2):306–308.
53. García de la Fuente JN. Vacunas inactivadas frente al aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AERP): Análisis de la protección inducida por vacunas comerciales y de nuevo diseño en un modelo ovino. [Tesis Doctoral]. León (ES): Universidad de León; 2003.
54. Georgiou G, Segatori L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. Curr Opin Biotechnol. 2005;16(5):538-545.
55. Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. Microbiol Mol Biol Rev. 2004;68(4):771–795.
56. Gimenez DF. Staining Rickettsiae in yolk-sac cultures. Stain Technol. 1964 39(1)135-40.
57. Greig JR. Enzootic abortion in ewes. Vet Rec. 1936;48:1226-1227.
58. Hackstadt T, Scidmore-Carlson MA, Shaw EI, Fischer ER. The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. Cell Microbiol. 1999;1(2):119-130.
59. Hackstadt T. Initial interactions of Chlamydiae with the host cell. En: Tan M., Bavoil PM. editores. Intracellular Pathogens 1: Chlamydiales Vol. 1. USA: ASM press; 2012 p. [126–148].
60. Hagemann JB, Simnacher U, Longbottom D, Livingstone M, Maile J, Soutschek E, Walder G, Boden K, Sachse K, Essig A. Analysis of humoral immune responses to surface and virulence-associated *Chlamydia abortus* proteins in ovine and human abortions by use of a newly developed line immunoassay. J Clin Microbiol. 2016;54(7):1883-1890.
61. Hagemann J H, Moelleken K. Chlamydial adhesion and adhesins. En: Tan M, Bavoil PM. Editors. Intracellular Pathogens 1: Chlamydiales Vol. 1. USA: ASM press; 2012 p.[97–125].

62. Hatch TP, Allan I, Pearce JH. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J Bacteriol.* 1984;157(1):13–20.
63. Heinzen RA, Scidmore MA, Rockey DD, Hackstadt T. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1996;64(3):796–809.
64. Hepler RW, Nahas DD, Lucas B, Kaufhold R, Flynn JA, Galli JD, Swoyer R, Wagner JM, Espeseth AS, Joyce JG, Cook JC, Durr E. Spectroscopic analysis of chlamydial major outer membrane protein in support of structure elucidation. *Protein Sci.* 2018;27(11):1923-1941.
65. Hoelzle LE, Hoelzle K, Wittenbrink MM. Expression of the major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, and *Chlamydia suis* in *Escherichia coli* using an arabinose-inducible plasmid vector. *J Vet Med B.* 2003;50(8):383-389.
66. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(2):379–433.
67. Jiménez-Estrada JM, Escobedo-Guerra MR, Arteaga-Troncoso G, López-Hurtado M, Haro-Cruz MJ, Montes de Oca Jiménez R, Guerra-Infante FM Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep (*Ovis aries*) in Mexico. *Am J Anim Vet Sci.* 2008;3(4):91–95.
68. Jones HM, Kubo A, Stephens RS. Design, expression and functional characterization of a synthetic gene encoding the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. *Gene.* 2000;258(1-2):173–181.
69. Jones RB, Van der Pol B, Martin DH, Shepard MK. Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *J Infect Dis.* 1990;162(6):1309–1315.
70. Kaltenboeck B, Heard D, DeGraves FJ, Schmeer N. Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *J Clin Microbiol.* 1997;35(9):2293–2298.
71. Kaul R, Duncan MJ, Guest J, Wenman WM. Expression of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein-encoding gene in *Escherichia coli*: role of the 3' end in mRNA stability. *Gene.* 1990;87(1):97-103.
72. Kerr K, Entrican G, McKeever D, Longbottom D. Immunopathology of *Chlamydophila abortus* infection in sheep and mice. *Res Vet Sci.* 2005;78(1):1-7.
73. Koehler JE, Birkelund S, Stephens RS. Overexpression and surface localization of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1992;6(9):1087-1094.
74. Kosma P. Chlamydial lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1455(2-3):387-402.
75. Kuo CC, Puolakkainen M, Lin TM, Witte M, Campbell LA. Mannose-receptor positive and negative mouse macrophages differ in their susceptibility to infection by *Chlamydia* species. *Microb Pathog.* 2002;32(1):43-48.
76. Kuo CC, Takahashi N, Swanson AF, Ozeki Y, Hakomori S. An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia*

- trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. J Clin Invest. 1996;98(12):2813-2818.
77. Lara AR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Rev Mex Ing Quim. 2011;10(2):209-223.
 78. Lazcano-Arrebillaga C. Detección de *Chlamydomphila* spp. en rebaños caprinos del Estado de Michoacán mediante técnica inmunodiagnóstica ELISA y aislamiento bacteriológico. [Tesis de Licenciatura]. Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2006.
 79. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. J Comp Pathol. 2003;128(4):217-244.
 80. Longbottom D, Fairley S, Chapman S, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydomphila abortus*. J Clin Microbiol. 2002;40(11):4235-4243.
 81. Marques PX, Souda P, O'Donovan J, Gutierrez J, Gutierrez EJ, Worrall S, McElroy M, Proctor A, Brady C, Sammin D, Basset HF, Whitelegge JP, Markey BE, Nally JE. Identification of immunologically relevant proteins of *Chlamydomphila abortus* using sera from experimentally infected pregnant ewes. Clin Vaccine Immunol. 2010;17(8):1274-1281.
 82. Marston FA. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem J. 1986;240(1):1-12.
 83. Martínez C. Papel de las células NK y de los Linfocitos T en la respuesta inmune frente a *Chlamydomphila abortus* en modelo murino. [Tesis Doctoral] Murcia (ES): Universidad de Murcia; 2006.
 84. Martínez SG. Desarrollo de una prueba de inmunoensayo enzimático para el diagnóstico de Clamidiosis en caprinos. [Tesis de Maestría] Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
 85. Matsumoto A. Surface projections of *Chlamydia psittaci* elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching. J Bacteriol. 1982;151(2):1040-1042.
 86. McCafferty MC, Maley SW, Entrican G, Buxton D. The importance of interferon-gamma in an early infection of *Chlamydia psittaci* in mice. Immunology 1994;81(4):631-636.
 87. McCauley LM, Lancaster MJ, Young P, Butler KL, Ainsworth CG. Comparison of ELISA and CFT assays for *Chlamydomphila abortus* antibodies in ovine sera. Aust Vet J. 2007;85(8):325-328.
 88. Meijer A, Kwakkel GJ, de Vries A, Schouls LM, Ossewaarde JM. Species identification of *Chlamydia* isolates by analyzing restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA spacer region. J Clin Microbiol 1997;35(5): 1179-1183.
 89. Miyairi I, Byrne GI. *Chlamydia* and programmed cell death. Curr Opin Microbiol. 2006;9(1):102-108.
 90. Moelleken K, Hegemann JH. The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. Mol Microbiol. 2008;67(2):403-419.

91. Moore ER, Ouellette SP. Reconceptualizing the chlamydial inclusion as a pathogen-specified parasitic organelle: an expanded role for Inc proteins. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:157.
92. Moore T, Ekworomadu CO, Eko FO, MacMillan L, Ramey K, Ananaba GA, Patrickson JW, Nagappan PR, Lyn D, Black CM, Igietseme JU. Fc receptor-mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens. *J Infect Dis.* 2003;188(4):617–624.
93. Mora-Díaz JC. Determinación de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato, México, con casos de aborto sugerentes de clamidiosis. [Tesis de Licenciatura] Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
94. Mora-Díaz JC, Díaz-Aparicio E, Herrera-López E, Suárez-Güemes F, Escalante-Ochoa C, Jaimes-Villareal S, Arellano-Reynoso B. Isolation of *Chlamydia abortus* in dairy goat herds and its relation to abortion in Guanajuato, Mexico. *Vet Mex.* 2015;2(1):1-11.
95. Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells *in vitro*. *Microbiol Rev.* 1991;55(1):143–190.
96. Moulder JW. The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol.* 1966;20:107-130.
97. Mpiga P, Ravaoarinoro M. *Chlamydia trachomatis* persistence: an update. *Microbiol Res* 2006;161(1):9–19.
98. Mueller KE, Plano GV, Fields KA. New frontiers in type III secretion biology: the *Chlamydia* perspective. *Infect Immun.* 2014;82(1), 2–9.
99. Nelson, D. E. The chlamydial cell envelope. En: Tan M, Bavoil PM. Editors. *Intracellular Pathogens 1: Chlamydiales Vol. 1.* USA: ASM press; 2012 p.[74-96].
100. Nurminen M, Leinonen M, Saikku P, Mäkelä PH. The genus-specific antigen of *Chlamydia*: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria. *Science* 1983;220(4603):1279-1281.
101. O’Connell CM, Ionova IA, Quayle AJ, Visintin A, Ingalls RR. Localization of TLR2 and MyD88 to *Chlamydia trachomatis* inclusions. Evidence for signaling by intracellular TLR2 during infection with an obligate intracellular pathogen. *J Biol Chem.* 2006;281(3):1652–1659.
102. OIE. Enzootic abortion of ewes (Ovine Chlamydiosis) (Infection with *Chlamydia abortus*) Chapter 3.7.5. En: OIE Terrestrial Manual. París (FR). 2018 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.07.05_ENZ_ABOR.pdf
103. Ortega N, Caro MR, Gallego MC, Murcia-Belmonte A, Álvarez D, Del Río L, Cuello F, Buendía AJ, Salinas J. Isolation of *Chlamydia abortus* from a laboratory worker diagnosed with atypical pneumonia. *Ir Vet J.* 2016;69(8):1-4.
104. Page LA. Revision of the family Chlamydiaceae rake (*rickettsiales*): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945. *Int J Syst bacterial.* 1966;16(2): 223-252.
105. Pal S, Theodor I, Peterson EM, de la Maza LM. Immunization with the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis major outer membrane protein can elicit a protective immune response against a genital challenge. *Infect Immun.* 2001;69(10):6240-6247.

106. Pantchev A, Sting R, Bauerfeind R, Tyczka J, Sachse K. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010;33(6):473–484.
107. Peeling R, Maclean IW, Brunham RC. *In vitro* neutralization of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibody to an epitope on the major outer membrane protein. *Infect Immun*. 1984;46(2):484–488.
108. Perfettini JL, Darville T, Gachelin G, Souque P, Huerre M, Dautry-Varsat A, Ojcius DM. Effect of *Chlamydia trachomatis* infection and subsequent tumor necrosis factor alpha secretion on apoptosis in the murine genital tract. *Infect Immun*. 2000;68(4):2237–2244.
109. Peters J, Wilson DP, Myers G, Timms P, Bavoil PM. Type III secretion à la *Chlamydia* *Trends Microbiol*. 2007;15(6):241-251.
110. Pickett MA, Ward ME, Clarke IN. High-level expression and epitope localization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. *Mol Microbiol*. 1988;2(5):681–685.
111. Pospischil A. Enzootic abortion in ewes: A review of recent developments in diagnostics. *Small Rum Res*. 2006;62(1-2):113-115.
112. Pospischil A, Borel N, Andersen AA. *Chlamydia*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. (4th Ed) Aims, Iowa (USA):Blackwell Publishing; 2010.
113. Prebeck S, Brade H, Kirschning CJ, da Costa CP, Dürr S, Wagner H, Miethke T. The Gram-negative bacterium *Chlamydia trachomatis* L2 stimulates tumor necrosis factor secretion by innate immune cells independently of its endotoxin. *Microbes Infect*. 2003;5(6):463–470.
114. Qiagen. Protocol 6. Determination of target protein solubility. En: *The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. 5 Ed. 2003. P.59-60.
115. Roan NR, Starnbach MN. Immune-mediated control of *Chlamydia* infection. *Cell Microbiol* 2008;10(1),9–19.
116. Rodolakis A, Mohamad KY. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):382-391.
117. Rodolakis A, Souriau A. Clinical evaluation of immunity following experimental or natural infection of ewes with *Chlamydia psittaci* (var ovis). *Ann Rech Vet*. 1980;11(2):215–223.
118. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5:172.
119. Rubio-Navarrete I, Montes-de-Oca-Jiménez R, Acosta-Dibarrat J, Monroy-Salazar HG, Morales-Erasto V, Fernández-Rosas P, Elghandour MMY, Odongo EN. Prevalence of *Chlamydia abortus* antibodies in horses from the northern state of Mexico and its relationship with domestic animals. *J Equine Vet Sci*. 2017;56:110-113.
120. Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B, Stephens RS, Kuo CC, Rosselló-Móra R, Horn M. Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst Appl Microbiol*. 2015;38(2):99–103.
121. Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Creasy HH, Weidmann M, Myers G, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Liebler-Tenorio E, Ruettger A, Bavoil

- PM, Hufert FT, Rosselló-Móra R, Marz, M. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. Syst Appl Microbiol. 2014;37(2):79–88.
122. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. Vet Microbiol. 2009;135(1-2):2-21.
 123. Saïda F, Uzan M, Odaert B, Bontems F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. Curr Protein Pept Sci. 2006;7(1):47–56.
 124. Salinas J, Sanchez J, Buendia AJ, Souriau A, Rodolakis A, Bernabé A, Cuello F. The LPS localization might explain the lack of protection of LPS-specific antibodies in abortion-causing *Chlamydia psittaci* infections. Res Microbiol. 1994;145(8):611-620.
 125. Salinas J, Souriau A, Cuello F, Rodolakis A. Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. Vet Microbiol. 1995;43(2–3):219–226.
 126. Salti-Montesanto V, Tsoli E, Papavassiliou P, Psarrou E, Markey BK, Jones GE, Vretou E. Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. Am J Vet Res. 1997;58(3):228–235.
 127. Sánchez RL. Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras de México. [Tesis de Maestría] Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
 128. Sardinia LM, Segal E, Ganem D. Developmental regulation of the cysteine-rich outer-membrane proteins of murine *Chlamydia trachomatis*. J Gen Microbiol. 1988;134(4):997–1004.
 129. Schmeer N, Krauss H, Apel J, Adami M, Müller HP, Schneider W, Perez-Martinez JA, Rieser H. Analysis of caprine IgG1 and IgG2 subclass responses to *Chlamydia psittaci* infection and vaccination. Vet Microbiol. 1987;14(2):125-135.
 130. Souriau A, Le Rouzic E, Bernard F, Rodolakis A. Differentiation of abortion-inducing and intestinal strains of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants by the microimmunofluorescence test. Vet Rec. 1993;132(9):217–219.
 131. Spencer WN, Johnson FW. Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. Vet Rec. 1983;113(23):535-536.
 132. Stamp JT, McEwen AD, Watt JA, Nisbet DI. Enzootic abortion in ewes; transmission of the disease. Vet Rec. 1950;62(17):251-254.
 133. Steele LN, Balsara ZR, Starnbach MN. Hematopoietic cells are required to initiate a *Chlamydia trachomatis*-specific CD8+ T cell response. J Immunol. 2004;173(10):6327–6337.
 134. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science. 1998;282(5389):754–759.
 135. Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. J. Bacteriol. 1987;169(9):3879-3885.

136. Su H, Caldwell HD. *In vitro* neutralization of *Chlamydia trachomatis* by monovalent Fab antibody specific to the major outer membrane protein. *Infect Immun.* 1991;59(8):2843-2845.
137. Su H, Raymond L, Rockey DD, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell HD. A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(20):11143–11148.
138. Su H, Watkins NG, Zhang YX, Caldwell HD. *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun.* 1990; 58(4):1017–1025.
139. Tan C, Hsia RC, Shou H, Carrasco JA, Rank RG, Bavoil PM. Variable expression of surface-exposed polymorphic membrane proteins in *in vitro*-grown *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol.* 2010;12(2):174–187.
140. Tanzer RJ, Hatch TP. Characterization of outer membrane proteins in *Chlamydia trachomatis* LGV serovar L2. *J Bacteriol.* 2001;183(8):2686–2690.
141. Thejls H, Gnarpe J, Gnarpe H, Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Ostergaard L, Victor A. Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology. *Genitourin Med.* 1994;70(5):300-303.
142. Thomson NR, Yeats C, Bell K, Holden MT, Bentley SD, Livingstone M, Cerdeño-Tárraga AM, Harris B, Doggett J, Ormond D, Mungall K, Clarke K, Feltwell T, Hance Z, Sanders M, Quail MA, Price C, Barrell BG, Parkhill J, Longbottom D. The *Chlamydophila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Res.* 2005;15(5):629–640.
143. Vanrompay D, Geens T, Desplanques A, Hoang TQ, De Vos L, Van Loock M, Huyck E, Mirry C, Cox E. Immunoblotting, ELISA and culture evidence for Chlamydiaceae in sows on 258 Belgian farms. *Vet Microbiol.* 2004;99(1):59–66.
144. Vasilevsky S, Stojanov M, Greub G, Baud D. Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates. *Virulence.* 2016;7(1):1 1-22.
145. Villegas E, Solórzano A, Camacho A, Gutiérrez J. *Chlamydophila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(10):629-37.
146. Vorimore F, Hsia RC, Huot-Creasy H, Bastian S, Deruyter L, Passet A, Sachse K, Bavoil P, Myers G, Laroucau K. Isolation of a new *Chlamydia* species from the feral sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e74823.
147. Vretou E, Radouani F, Psarrou E, Kritikos I, Xylouri E, Mangana O. Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydophila abortus* antibodies. *Vet Microbiol.* 2007;123(1-3):153-161.
148. Wang Y, Berg EA, Feng X, Shen L, Smith T, Costello CE, Zhang YX. Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. *Protein Sci* 2006;15(1): 122–134.

149. Wehrl W, Brinkmann V, Jungblut PR, Meyer TF, Szczeppek AJ. From the inside out processing of the chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol.* 2004;51(2):319–334.
150. Wen Z, Boddicker MA, Kaufhold RM, Khandelwal P, Durr E, Qiu P, Lucas BJ, Nahas DD, Cook JC, Touch S, Skinner JM, Espeseth AS, Przysiecki CT, Zhang L. Recombinant expression of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein in *E. Coli* outer membrane as a substrate for vaccine research. *BMC Microbiol.* 2016;16(1):165.
151. Wheelhouse N, Longbottom D. Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59(4),283–291.
152. Wheelhouse N, Sait M, Wilson K, Aitchison K, McLean K, Smith DG, Longbottom D. Expression patterns of five polymorphic membrane proteins during *Chlamydia abortus* developmental cycle. *Vet Microbiol.* 2012;160(3-4):525-529.
153. Wilson K, Livingstone M, Longbottom D. Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydia abortus* infection in sheep. *Vet Microbiol.* 2009;135(1-2):38-45.
154. Wingfield PT. Overview of the purification of recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. 2003 Chapter 6 Unit 6.1 In: *Curr protoc Protein Sci*, vol. 1, Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT. eds. John Wiley and Sons, New York, pp. 6.1.1–6.1.22.
155. Yen TY, Pal S, de la Maza LM. Characterization of the disulfide bonds and free cysteine residues of the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis major outer membrane protein. *Biochemistry.* 2005;44(16):6250–6256.
156. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol.* 2007;127(3):335–347.
157. Yoshida H, Kishi Y, Shiga S, Hagiwara T. Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Microbiol Immunol.* 1998;42(5):411-414.
158. Zhang JP, Stephens RS. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell.* 1992;69(5):861–869.

12. ANEXOS

Anexo I. Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research, California, EUA)

Preparación de gel

1. Después de realizar la electroforesis, cortar la banda de ADN de interés y colocar en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Añadir 10 µL de Membrane Binding Solution por cada 10 mg de gel. Mezclar e incubar a 50 °C hasta que el gel este completamente disuelto.

Unión de ADN

1. Insertar la mini columna SV en el tubo colector.
2. Transferir la mezcla del gel disuelto a la mini columna ensamblada. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
3. Centrifugar a 16000 x g por 1 min. Descartar el filtrado y reinsertar la columna en el tubo colector.

Lavado

4. Agregar 700 µL de Membrane Wash Solution (con etanol añadido). Centrifugar 16000 x g por 1 min. Descartar el filtrado y reinsertar la columna en el tubo colector.
5. Repetir el paso 4 con 500 µL de Membrane Wash Solution. Centrifugar 16000 x g por 5 min.
6. Vaciar el tubo colector y centrifugar la columna por 1 min para la evaporación de etanol residual.
7. Transferir la mini columna a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL.
8. Añadir 50 µL de agua libre de nucleasas. Incubar a temperatura ambiente 1 min y centrifugar a 16000 x g por 1 min.

Anexo II. AxyPrep Plasmid Miniprep Kit

1. Colectar 1-4 mL de cultivo previamente incubado 16 h. Centrifugar a 12000 x *g* por 1 min para obtener la pastilla bacteriana y decantar el sobrenadante.
2. Resuspender la pastilla bacteriana en 250 μ L de Buffer S1 y mezclar con agitador vortex. Asegurarse que está completamente resuspendido antes de proceder.
3. Añadir 250 μ L de Buffer S2, y mezclar gentilmente por inversión del tubo de 4-6 veces. No mezclar con agitador.
4. Añadir 350 μ L de Buffer S3, mezclar gentilmente por inversión del tubo de 4-6 veces. No mezclar con agitador. Centrifugar a 12000 x *g* por 10 min.
5. Poner la columna Miniprep en un tubo colector de 2 mL. Transferir el sobrenadante clarificado del paso 4 a la columna, centrifugar a 12000 x *g* por 1 min.
6. Paso opcional: Lavar con Buffer W1
7. Lavar con 700 μ L de Buffer W2. Centrifugar a 12000 x *g* por 1 min.
8. Paso opcional: Descartar el filtrado. Segundo lavado con 700 μ L Buffer W2. Centrifugar a 12000 x *g* por 1 min.
9. Descartar el filtrado. Centrifugar a 12000 x *g* por 1 min.
10. Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL. Eluir con 60-80 μ L de agua libre de nucleasas. Incubar a temperatura ambiente 1 min. Centrifugar a 12000 x *g* por 1 min.
11. Proceder a la cuantificación del eluido.

Anexo III. Buffer de Lisis

Buffer A (1 L)

100 mM NaH₂PO₄ 13.8 g NaH₂PO₄·H₂O (Peso Molecular: 137.99 g/mol)
10 mM Tris 1.2 g Tris base (Peso Molecular: 121.1 g/mol)
6 M GuHCl 573 g Hidrocloruro de Guanidina (Peso Molecular: 95.53 g/mol)
H₂O destilada c.b.p. 1L
Ajustar a pH 8.0 con NaOH

Buffer B (1 L)

100 mM NaH₂PO₄ 13.8 g NaH₂PO₄·H₂O (Peso Molecular: 137.99 g/mol)
10 mM Tris 1.2 g Tris base (Peso Molecular: 121.1 g/mol)
8 M Urea 480.5 g (Peso Molecular: 60.06 g/mol)
H₂O destilada c.b.p. 1L
Ajustar a pH 8.0 con NaOH

Buffer C (1 L)

100 mM NaH₂PO₄ 13.8 g NaH₂PO₄·H₂O (Peso Molecular: 137.99 g/mol)
10 mM Tris 1.2 g Tris base (Peso Molecular: 121.1 g/mol)
8 M Urea 480.5 g (Peso Molecular: 60.06 g/mol)
H₂O destilada c.b.p. 1L
Ajustar a pH 6.3 con HCl