



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE SUPERFICIE EN
MONOCITOS Y ESTUDIOS DE PROTEÍNAS DE LA
MEMBRANA EXTERNA PARA EL CONTROL DE LA
ENFERMEDAD DE GLÄSSER.**



Álvaro Álvarez Estrada

León, julio de 2017



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



Directores de Tesis Doctoral:

Dr. Elías Fernando Rodríguez Ferri
Dr. César Bernardo Gutiérrez Martín
Dra. Sonia Martínez Martínez



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE SUPERFICIE EN
MONOCITOS Y ESTUDIOS DE PROTEÍNAS DE LA
MEMBRANA EXTERNA PARA EL CONTROL DE LA
ENFERMEDAD DE GLÄSSER.**

Álvaro Álvarez Estrada

León, 2017

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a mis Directores de Tesis Elías F. Rodríguez Ferri, Cesar B. Gutiérrez Martín y Sonia Martínez Martínez; sin sus enseñanzas, ánimo y ayuda no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A todo el personal del Laboratorio de Inmunología Porcina del INIA donde pude aprender los fundamentos de la citometría de flujo, especialmente a Javier Domínguez Juncal, por haberme acogido en su Grupo de Investigación durante mi estancia, y a Teresa Fernández, Belén Álvarez y Concepción Revilla, quienes me brindaron tanto su conocimiento como su amistad.

A la gente con quien tuve el placer de coincidir durante mi estancia en Passo Fundo, a Rafael Frandoloso por recibirme en su laboratorio, a Rafael Pandolfi y João Guizzo por los buenos momentos compartidos y por su ayuda.

A mis compañeros del departamento de Sanidad Animal con los que he coincidido a lo largo de estos años, Isora, Germán, Pani, Tere, Marta y especialmente a Sheila Yubero y Javier Peñalba.

A mis padres José Antonio y Mari Carmen y a mi inseparable amor Lidia, para los cuales no se me ocurren las palabras de agradecimiento por su apoyo.

A todos mis amigos, en especial a Alberto y Aroa, por habernos acompañado tanto a Lidia como a mí en León y, en el caso de Aroa, también por ayudarme con mis investigaciones.

Indicar que esta Tesis Doctoral ha sido subvencionada por el Ministerio de Economía y Competitividad (Secretaría de Estado de Investigación e Innovación, Secretaría General de Ciencia, Tecnología e Innovación, Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Subdirección General de Proyectos de Investigación), a través del Proyecto AGL2011-23195 y de una beca de Formación de Personal Investigador (BES-2012-059833) vinculada al mismo. Por todo esto quisiera dar las gracias a las administraciones públicas que, gracias a su financiación, permiten el desarrollo y comienzo de carreras investigadoras.

ÍNDICES

ÍNDICE PRINCIPAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Enfermedad de Glässer	3
1.1.1. Breve historia de la enfermedad	3
1.1.2. Etiología	3
1.1.2.1. Taxonomía	4
1.1.2.2. Morfología	4
1.1.2.3. Cultivo	5
1.1.2.4. Serotipado	6
1.1.2.5. Tipado mediante el perfil de las proteínas de la membrana externa	9
1.1.2.6. Tipado mediante procedimientos con ADN	9
1.1.3. Epidemiología	11
1.1.4. Patogenia	12
1.1.4.1. Evasión del sistema inmunitario en el aparato respiratorio	12
1.1.4.2. Acceso a la circulación sanguínea y diseminación de la bacteria por el organismo	14
1.1.4.3. Invasión de órganos y de cavidades corporales	14
1.1.4.4. Factores de virulencia	15
1.1.4.4.1. Proteína de la membrana externa P2 (OMP-P2)	15
1.1.4.4.2. Lipooligosacárido (LOS)	15
1.1.4.4.3. Recubrimiento por ácido siálico de los lipooligosacáridos (LOS)	15
1.1.4.4.4. Cápsula	16
1.1.4.4.5. ¿Hemolisinas?	16
1.1.4.4.6. Autotransportadores triméricos asociados a la virulencia (VtaAs)	17
1.1.4.4.7. Fimbrias	17
1.1.4.4.8. Toxinas de distensión citoletales (CDTs)	17
1.1.4.4.9. Captación por la bacteria de hierro del hospedador	18
1.1.5. Cuadro clínico y lesiones	19
1.1.6. Diagnóstico	20
1.1.6.1. Diagnóstico de presunción	20
1.1.6.2. Muestreo y aislamiento	20
1.1.6.3. Identificación	21
1.1.6.4. Diagnóstico serológico	23

1.1.6.5. Perfil proteico mediante espectrometría de masas	23
1.1.7. Tratamiento	24
1.1.8. Prevención	25
1.1.8.1. Vacunación	25
1.1.8.1.1 Vacunas inactivadas	26
1.1.8.1.2. Vacunas de subunidades	27
1.2. <i>Haemophilus parasuis</i> y el complejo respiratorio porcino	33
1.3. Fisiopatología de la sepsis	35
1.3.1. Conceptos	35
1.3.2. Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)	36
1.3.2.1. Receptores tipo Toll (TLRs)	37
1.3.2.2. Receptores tipo NOD (NLRs)	41
1.3.2.3. Otros receptores de reconocimiento de patrones	42
1.3.3. La tormenta de citoquinas	42
1.3.4. Lectinas tipo inmunoglobulinas de unión a ácido siálico (Siglec)	43
1.3.4.1. Ácidos siálicos	43
1.3.4.2. Fisiología de los Siglecs	44
1.3.4.3. Explotación por los patógenos de la inhibición inmunitaria mediada por la interacción Siglec - ácido siálico	46
1.3.4.4. Mecanismos de lucha del hospedador frente a patógenos recubiertos de ácido siálico	48
1.3.4.5. Siglecs porcinos	49
1.3.4.6. Recubrimiento de <i>Haemophilus parasuis</i> por ácido siálico	49
1.3.5. Receptor CD163	50
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1. Instalaciones	61
3.2. Microorganismos	61
3.2.1. <i>Haemophilus parasuis</i>	61
3.2.2. <i>Escherichia coli</i>	61
3.3. Animales	62

3.3.1. Conejos	62
3.3.2. Cerdos privados de calostro	62
3.4. Productos y reactivos	62
3.4.1. Productos y reactivos microbiológicos generales	62
3.4.1.1. Medios de cultivo de <i>Haemophilus parasuis</i>	62
3.4.1.2. Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	63
3.4.1.3. Medio de congelación de bacterias	63
3.4.1.4. Medio de inóculo para el desafío con <i>Haemophilus parasuis</i>	63
3.4.1.5. Solución salina estéril	63
3.4.1.6. Soluciones de <i>stock</i> de suplementos para medios de cultivo	64
3.4.2. Productos y reactivos para procedimientos con ácidos nucleicos	64
3.4.2.1 Cebadores	64
3.4.2.2. Vector de clonación	66
3.4.2.3. PCR convencional	66
3.4.2.3.1. Amplificación de los genes de las proteínas	66
3.4.1.3.2. Amplificación del gen codificante de ARN ribosómico 16S para la detección de <i>Haemophilus parasuis</i>	66
3.4.2.4. PCR en tiempo real	66
3.4.2.5. Extracción de ácidos nucleicos (ADN o ARN)	67
3.4.2.6. Purificación de productos de PCR	67
3.4.2.7. Eliminación de ADN genómico en muestras de ARN	67
3.4.2.8. Retrotranscripción	67
3.4.2.9. Electroforesis en gel de agarosa	67
3.4.3. Productos y reactivos para procedimientos con proteínas	68
3.4.3.1. Extracción, replegado y purificación proteica	68
3.4.3.2. Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)	69
3.4.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	69
3.4.3.4. <i>Western Blot</i>	71
3.4.4. Productos y reactivos para la preparación de los antígenos vacunales	73
3.4.5. Productos y reactivos para citometría de flujo	73
3.4.5.1 Aislamiento de células mononucleares sanguíneas de sangre periférica (PBMCs)	73

3.4.5.2. Tinción de PBMCs para su recuento al microscopio	74
3.4.5.3. Tampones para citometría de flujo	74
3.4.5.4. Anticuerpos empleados en citometría de flujo	75
3.4.6. Productos y reactivos para la técnica ELISA	76
3.4.6.1. Tampones y soluciones	76
3.4.6.2. Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa	77
3.5. Herramientas bioinformáticas “on-line” y programas informáticos	78
3.5.1. Estudio y clonaje de las proteínas OMP P2, P5 y D15	78
3.5.2. Citometría de flujo	79
3.5.2.1. Análisis de datos de la citometría de flujo	79
3.5.3. PCR en tiempo real	79
3.5.4. Estudio del transcriptoma por RNA sequencing	80
3.5.5. Análisis estadísticos	81
3.6. Protocolos de técnicas habituales	81
3.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	81
3.6.2. ELISA indirecto	82
3.6.2.1. Tapizado de placas con las proteínas recombinantes	82
3.6.2.2. Tapizado de placas con bacterias inactivadas	82
3.6.2.3. Adición de los sueros y conjugado: desarrollo del ELISA indirecto	83
3.6.3. Western blot	83
3.6.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) previa	83
3.6.3.2. Transferencia a la membrana de nitrocelulosa	83
3.6.3.3. Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa	84
3.6.3.4. Realización del <i>Western blot</i>	84
3.7. Valoración de tres proteínas de membrana externa de la cepa Nagasaki de <i>Haemophilus parasuis</i> como antígenos vacunales contra la enfermedad de Glässer en cerdos	85
3.7.1. Producción de proteínas de membrana externa recombinantes	85
3.7.1.1. Estudio bioinformático preliminar de las proteínas	85
3.7.1.2. Cultivo de <i>Haemophilus parasuis</i> para la extracción de su ADN	85
3.7.1.3. Diseño de los cebadores y amplificación de los genes	86
3.7.1.3.1. Diseño de los cebadores	86

3.7.1.3.2. Elección de la temperatura de anillamiento	86
3.7.1.3.3. PCRs de amplificación de los fragmentos génicos de interés	86
3.7.1.4. Clonación de los fragmentos génicos amplificados en <i>Escherichia coli</i> TOP10	87
3.7.1.5. Purificación de amplicones	88
3.7.1.6. Inserción de los fragmentos génicos en los vectores de expresión	88
3.7.1.7. Transformación de <i>Escherichia coli</i> TOP10	89
3.7.1.8. Selección de los transformantes de <i>Escherichia coli</i> TOP10	89
3.7.1.9. Transformación de <i>Escherichia coli</i> LMG194 con los vectores de expresión	92
3.7.1.9.1. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> LMG194	92
3.7.1.9.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i> LMG194 y selección de transformantes	92
3.7.1.10. Producción de las proteínas recombinantes	93
3.7.1.10.1. Inducción de la expresión proteica	93
3.7.1.10.2. Extracción proteica	93
3.7.1.10.3. Purificación proteica mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)	94
3.7.1.10.4. Reconocimiento de las proteínas recombinantes por sueros procedentes de cerdos previamente expuestos a <i>Haemophilus parasuis</i>	94
3.7.2. Valoración de la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes en conejos	96
3.7.2.1. Descripción del modelo animal	96
3.7.2.2. Preparación de las dosis de antígeno	97
3.7.2.3. Obtención de los sueros	97
3.7.2.4. ELISAs indirectos con los sueros de los conejos	97
3.7.3. Valoración de la eficacia protectora de las proteínas recombinantes en el cerdo frente al desafío con la cepa Nagasaki de <i>Haemophilus parasuis</i>	98
3.7.3.1. Obtención de calostro bovino	98
3.7.3.2. Obtención y cría de cerdos privados de calostro materno	100
3.7.3.3. Inmunización con proteínas recombinantes	102
3.7.3.3.1. Separación de los animales en grupos experimentales	102
3.7.3.3.2. Preparación de las dosis de antígenos vacunales	102
3.7.3.3.3. Pauta de inmunización	103
3.7.3.4. Infección experimental	103
3.7.3.4.1. Curvas de crecimiento de <i>Haemophilus parasuis</i>	103
3.7.3.4.2. Preparación del inóculo para el desafío	104

3.7.3.4.3. Desafío	105
3.7.3.4.4. Curso de la infección	105
3.7.3.4.5. Necropsia y toma de muestras	106
3.7.3.4.6. Aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i>	107
3.7.3.5. Estudios serológicos	108
3.7.3.5.1. Obtención de sueros	108
3.7.3.5.2. ELISAs indirectos con los sueros de cerdos procedentes de la prueba experimental	108
3.7.3.6. Estudio de genes relacionados con la respuesta inmunitaria mediante PCR en tiempo real	109
3.7.3.6.1. Extracción y conservación del ARN	109
3.7.3.6.2. Eliminación del ADN genómico y síntesis del ADN complementario (ADNc)	109
3.7.3.6.3. Genes investigados	109
3.7.3.6.4. Protocolo de la PCR en tiempo real	110
3.7.3.6.5. Análisis de datos	110
3.8. Estudio de receptores relacionados con la sepsis sobre células mononucleares de sangre periférica en cerdos infectados con <i>Haemophilus parasuis</i>	111
3.8.1. Aislamiento y conservación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	111
3.8.2. Descongelación de PBMCs	112
3.8.3. Recuento de PBMCs	112
3.8.4. Dobles marcajes	113
3.8.4.1. Procedimiento de los dobles marcajes	113
3.8.4.2. Dobles marcajes realizados	114
3.8.4.2.1. Dobles marcajes con anti-CD172a	114
3.8.4.2.2. Dobles marcajes con 6D10	115
3.8.4.2.3. Dobles marcajes con anti-CD163	115
3.8.5. Citómetros utilizados y análisis de datos	116
3.9. Búsqueda mediante estudios transcriptómicos de proteínas sobreexpresadas en la superficie de <i>Haemophilus parasuis</i> en condiciones de cultivo miméticas a la infección	117
3.9.1. Curvas de crecimiento de <i>Haemophilus parasuis</i>	117
3.9.1.1. Procedimiento de elaboración de las curvas	118

3.9.2. Obtención de las muestras de ARN	118
3.9.2.1. Extracción de ARN	118
3.9.2.2. Eliminación del ADN contaminante	118
3.9.2.3. Comprobación de la integridad del ARN	119
3.9.3. Preparación de la librería de ADNc, secuenciación y análisis bioinformático de expresión diferencial	119
3.9.3.1. Eliminación del ARN ribosómico (ARNr)	119
3.9.3.2. Preparación de la librería de ADNc	119
3.9.3.3. Secuenciación	119
3.9.3.4. Análisis bioinformático de expresión diferencial	120
3.9.4. Estudios sobre los genes expresados de forma diferencial	121
4. RESULTADOS	123
4.1. Valoración de tres proteínas de membrana externa de la cepa Nagasaki de <i>Haemophilus parasuis</i> como antígenos vacunales contra la enfermedad de Glässer en cerdos	125
4.1.1 Estudio bioinformático preliminar de las proteínas para seleccionar los fragmentos de los genes a clonar	125
4.1.1.1. Secuencias utilizadas	125
4.1.1.2. Predicción del péptido señal	125
4.1.1.3. Búsqueda de motivos y dominios	127
4.1.1.4. Estudio de las estructuras de barril β	127
4.1.1.5. Comparación de las secuencias de las proteínas P2 y P5 entre la cepa Nagasaki y la cepa SH0165	129
4.1.2. Producción de proteínas recombinantes de la membrana externa	132
4.1.2.1. Amplificación y clonación de fragmentos génicos	132
4.1.2.2. Expresión, extracción y purificación proteica	134
4.1.2.3. Reconocimiento de las proteínas recombinantes por inmunoglobulinas G de suero procedente de cerdos previamente expuestos a <i>Haemophilus parasuis</i>	135
4.1.3. Valoración de la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes en conejos	137

4.1.4. Valoración de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes frente a <i>Haemophilus parasuis</i> en cerdos privados de calostro	138
4.1.4.1. Infección experimental	138
4.1.4.1.1. Signos clínicos y supervivencia	138
4.1.4.1.2. Lesiones macroscópicas	140
4.1.4.1.3. Lesiones microscópicas	145
4.1.4.1.4. Aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i> a partir de muestras obtenidas en las necropsias	151
4.1.4.2. Estudio de la respuesta inmune humoral en los diferentes grupos experimentales porcinos	153
4.1.4.3. Estudio de la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta inmune mediante PCR en tiempo real	159
4.2. Estudio de receptores relacionados con la sepsis sobre células mononucleares de sangre periférica en cerdos infectados con <i>Haemophilus parasuis</i>	161
4.2.1. Infección experimental	161
4.2.2. Establecimiento de regiones tamaño / complejidad	162
4.2.3. Dobles marcajes con anti-CD172a	163
4.2.3.1. Resultados con TLR-2	168
4.2.3.2. Resultados de Siglec-3	168
4.2.3.3. Resultados de CD163	169
4.2.3.4. Resultados de TLR-4	170
4.2.3.5. Resultados de Siglec-5	171
4.2.3.6. Resultados de Siglec-1	171
4.2.3.7. Resultados de Siglec-10	172
4.2.4. Dobles marcajes con anti-CD163	173
4.2.4.1. Resultados de TLR-2	174
4.2.4.2. Resultados de Siglec-3	176
4.2.4.3. Resultados de TLR-4	178
4.2.4.4. Resultados de Siglec-5	179
4.2.4.5. Resultados de CD163	179
4.2.4.6. Resultados de Siglec-1	180
4.2.5. Dobles marcajes con anticuerpo monoclonal 6D10	181

4.3. Búsqueda mediante estudios transcriptómicos de proteínas sobreexpresadas en la superficie de <i>Haemophilus parasuis</i> en condiciones de cultivo miméticas a la infección	183
4.3.1. Curvas de crecimiento	183
4.3.2. Control de calidad de muestras de ARN	184
4.3.3. Control de calidad de las secuencias de las librerías	185
4.3.4. Genes expresados diferencialmente	186
4.3.4.1. Sobreexpresión en condiciones miméticas	187
4.3.4.1.1. Localización celular de las proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas	187
4.3.4.1.2. Búsqueda de proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas relacionadas con la patogenicidad	187
4.3.4.1.3. Análisis de enriquecimiento funcional de genes sobreexpresados en condiciones miméticas	189
4.3.4.1.4. Resumen de la sobreexpresión en condiciones miméticas	189
4.3.4.2. Subexpresión en condiciones miméticas	193
4.3.4.2.1. Localización celular de las proteínas subexpresadas en condiciones miméticas	193
4.3.4.2.2. Búsqueda de proteínas subexpresadas en condiciones miméticas relacionadas con la patogenicidad	193
4.3.4.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional de genes subexpresados en condiciones miméticas	194
4.3.4.2.4. Resumen de la subexpresión en condiciones miméticas	196
5. DISCUSIÓN	201
5.1. Valoración de tres proteínas de membrana externa de la cepa Nagasaki de <i>Haemophilus parasuis</i> como antígenos vacunales contra la enfermedad de Glässer en cerdos	203
5.1.1. Estudio de las secuencias aminoacídicas de las tres proteínas y selección del fragmento génico a clonar	203
5.1.2. Producción de proteínas recombinantes de la membrana externa	204
5.1.3. Valoración de la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes en conejos	205
5.1.4. Valoración de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes frente a <i>Haemophilus parasuis</i> en un modelo porcino	206
5.1.4.1. Desarrollo de la infección experimental	206
5.1.4.2. Respuesta inmune humoral	208

5.1.5. Posibles interpretaciones	210
5.2. Estudio de receptores relacionados con la sepsis sobre células mononucleares de sangre periférica en cerdos infectados con <i>Haemophilus parasuis</i>	215
5.2.1. Presencia de sepsis en los animales	215
5.2.2. Dobles marcajes con anti-CD172a	215
5.2.3. Dobles marcajes con el anticuerpo monoclonal 6D10	218
5.2.4. Dobles marcajes con anti-CD163	219
5.2.5. Posibles interpretaciones	220
5.3. Búsqueda mediante estudios transcriptómicos de proteínas sobreexpresadas en la superficie de <i>Haemophilus parasuis</i> en condiciones de cultivo miméticas a la infección	231
5.3.1. Condiciones de cultivo empleadas	231
5.3.2. Sobreexpresión en condiciones miméticas	234
5.3.2.1. Proteínas expuestas en la superficie bacteriana	234
5.3.2.2. Proteínas de choque térmico	239
5.3.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional	240
5.3.3. Subexpresión en condiciones miméticas	241
6. CONCLUSIONES	243
7. BIBLIOGRAFÍA	247
8. ANEXOS	275
8.1. Tabla resumen de genes sobreexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (<i>fold change</i>) > 10	277
8.2. Tabla resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (<i>fold change</i>) > 10	285
8.3. \log_2 (<i>fold change</i>) de todos los genes sobreexpresados en condiciones miméticas	295
8.4. \log_2 (<i>fold change</i>) de todos los genes subexpresados en condiciones miméticas	301
8.5. Genes sobreexpresados clasificados dentro del término GO:0003676 (unión a ácidos nucleicos)	307
9. RESUMEN	311
10. SUMMARY	317

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>Haemophilus parasuis</i>	4
Tabla 2	Cepas de referencia para cada serotipo de <i>Haemophilus parasuis</i>	8
Tabla 3	Resistencias a antibióticos en <i>Haemophilus parasuis</i>	25
Tabla 4	Diferentes OMP de <i>Haemophilus parasuis</i> que han mostrado protección	29
Tabla 5	Principales microorganismos relacionados con el Complejo Respiratorio Porcino.	33
Tabla 6	Localización en la célula, ruta de señalización y ligandos reconocidos por los diferentes TLRs	40
Tabla 7	Cebadores utilizados en esta Tesis Doctoral	65
Tabla 8	Geles de poliacrilamida	70
Tabla 9	Anticuerpos primarios empleados en la citometría de flujo	75
Tabla 10	Anticuerpos irrelevantes primarios empleados en la citometría de flujo	75
Tabla 11	Anticuerpos secundarios conjugados empleados en la citometría de flujo	75
Tabla 12	Mezcla maestra de PCR convencional para amplificar genes a clonar	87
Tabla 13	Mezcla maestra de PCR convencional para amplificar el gen 16S de <i>Haemophilus parasuis</i>	107
Tabla 14	Mezcla maestra de PCR en tiempo real	110
Tabla 15	Dobles marcajes realizados con anti-CD172a	114
Tabla 16	Dobles marcajes realizados con el anticuerpo monoclonal 6D10	115
Tabla 17	Dobles marcajes realizados con anti-CD163	116
Tabla 18	Secuencias aminoacídicas de las tres proteínas objeto de estudio	126
Tabla 19	Porcentajes de muertes en los diferentes grupos experimentales de cerdos	139
Tabla 20	Lesiones macroscópicas observadas en los animales durante la necropsia	141
Tabla 21	Lesiones microscópicas	145
Tabla 22	Aislamiento confirmado por PCR de <i>Haemophilus parasuis</i> en todos los cerdos	152
Tabla 23	Estadística de la PCR en tiempo real	159
Tabla 24	Aislamiento confirmado por PCR de <i>Haemophilus parasuis</i> en cerdos empleados para los estudios mediante citometría de flujo	161
Tabla 25	Presencia de exudado y fibrina en las cavidades corporales en cerdos empleados para los estudios mediante citometría de flujo	162
Tabla 26	Concentración, ratios y contaminación por ADN en muestras de ARN estudiadas	184
Tabla 27	Control de calidad de secuencias de librerías de ADNc	186
Tabla 28	Listado de proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas relacionadas con la patogenia y/o expuestas en la superficie	190
Tabla 29	Hallazgos en proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas no caracterizadas en bases de datos	192

Tabla 30	Términos GO enriquecidos entre los genes subexpresados en condiciones miméticas	195
Tabla 31	Listado de proteínas subexpresadas en condiciones miméticas relacionadas con la patogenia y/o expuestas en la superficie	197
Tabla 32	Hallazgos en proteínas subexpresadas en condiciones miméticas no caracterizadas en bases de datos	199
Tabla 33	Resumen de proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas y su empleo como antígenos vacunales	238
Tabla 34	Resumen de genes sobreexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (<i>fold change</i>) > 10	279
Tabla 35	Resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (<i>fold change</i>) > 10	287
Tabla 36	Todos los genes sobreexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (<i>fold Change</i>).	297
Tabla 37	Todos los genes subexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (<i>fold Change</i>).	303
Tabla 38	Genes sobreexpresados en condiciones miméticas clasificados en el término GO:0003676 (<i>nucleic acid binding</i>).	309

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1	Apariencia microscópica de <i>Haemophilus parasuis</i>	5
Imagen 2	Apariencia macroscópica de <i>Haemophilus parasuis</i>	6
Imagen 3	Informa favorable para la prueba experimental en cerdos del Comité de Ética	99
Imagen 4	Administración de calostro bovino mediante biberón	100
Imagen 5	Alojamiento en lechonerías	101
Imagen 6	Alojamiento en las instalaciones de Navafría	101
Imagen 7	Inoculación intratraqueal de la dosis de desafío	105
Imagen 8	Electroforesis con amplicones de los genes a clonar	132
Imagen 9	Colonias de transformantes	133
Imagen 10	SDS-PAGE tras extracción proteica	134
Imagen 11	<i>Western blots</i> para comprobar el reconocimiento de las proteínas por sueros de cerdos expuestos a la bacteria	135
Imagen 12	Desafío intratraqueal	140
Imagen 13	Pleuritis fibrinosa	142
Imagen 14	Artritis fibrinoso-purulenta en el tarso	142
Imagen 15	Presencia de exudado en el pericardio	143
Imagen 16	Ascitis y presencia de fibrina en la cavidad abdominal	143
Imagen 17	Neumonía	144
Imagen 18	Hemorragias en encéfalo	146
Imagen 19	Meningitis fibrinoso-purulenta	146
Imagen 20	Neumonía exudativa	147
Imagen 21	Infiltrado de linfocitos y macrófagos en tabiques alveolares	147
Imagen 22	Hemorragia y exudado de fibrina intraalveolar	148
Imagen 23	Pleuritis fibrinosa y trombosis	148
Imagen 24	Pleuritis fibrinoso-purulenta	149
Imagen 25	Infiltrado histiocitario en bazo	149
Imagen 26	Infiltrado de neutrófilos en bazo	150
Imagen 27	Necrosis de linfocitos en bazo	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de los conceptos de sepsis y SIRS	35
Figura 2	Esquema de las rutas de señalización de los TLRs	39
Figura 3	Esquema de la acción inhibitoria de un Siglec tipo ITIM	45
Figura 4	Esquema de los tipos de interacciones entre los Siglec ITIM y sus ligandos	46
Figura 5	Estructura del vector pBAD/Thio-TOPO®	88
Figura 6	Esquema del vector con la secuencia génica de interés	91
Figura 7	Cronograma por semanas de la prueba en conejos	97
Figura 8	Cronograma en días de la cría de lechones privados de calostro materno	101
Figura 9	Cronograma de las inmunizaciones, extracciones de sangre y desafío en cerdos.	106
Figura 10	Flujo de trabajo en el análisis de expresión diferencial de genes	120
Figura 11	Predicción del péptido señal	125
Figura 12	Barril β de P2	128
Figura 13	Barril β de P5	129
Figura 14	Barril β de D15	129
Figura 15	Alineamiento de las secuencias proteicas de la P2 entre cepas SH0165 y Nagasaki	130
Figura 16	Alineamiento de las secuencias proteicas de la P5 entre cepas SH0165 y Nagasaki	131
Figura 17	ELISAs indirectos para comprobar el reconocimiento por sueros de cerdos expuestos a la bacteria.	136
Figura 18	ELISAs indirectos con suero de conejos frente a las proteínas	137
Figura 19	ELISAs indirectos con suero de conejos frente a la bacteria	138
Figura 20	Esquema del procedimiento para aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i> en animales sospechosos de enfermedad de Glässer.	151
Figura 21	Cronograma de las inmunizaciones, extracciones de sangre y desafío en cerdos	153
Figura 22	ELISAs indirectos con sueros de cerdos del grupo control no inmunizado ni desafiado	154
Figura 23	ELISAs indirectos con sueros de cerdos del grupo control no inmunizado pero si desafiado	154
Figura 24	ELISAs indirectos con sueros de cerdos del grupo inmunizado con vacuna comercial	155
Figura 25	ELISAs indirectos con sueros de cerdos del grupo inmunizado con P2	156
Figura 26	ELISAs indirectos con sueros de cerdos del grupo inmunizado con P5	157

Figura 27	ELISAs indirectos con sueros de cerdos del grupo inmunizado con D15	157
Figura 28	ELISAs indirectos con sueros de cerdos del grupo inmunizado con las tres proteínas	158
Figura 29	Establecimiento de regiones tamaño/complejidad.	163
Figura 30	Selección de eventos CD172a ^{hi} sobre región de monocitos y de eventos CD172 ^l sobre región de linfocitos	164
Figura 31	Dot plots de la expresión de CD172a frente a la expresión de TLR-2, TLR-4, Siglec-3 y Siglec-5	165
Figura 32	Establecimientos de picos para cálculo de IFMN	166
Figura 33	Dot plots de la expresión de CD172a frente a la expresión de CD163, Siglec-1 y Siglec-10	167
Figura 34	Establecimiento de regiones positivas y negativas para la expresión de un marcador	167
Figura 35	Expresión de TLR-2 en eventos CD172a ^{hi}	168
Figura 36	Expresión de Siglec-3 en eventos CD172a ^{hi}	169
Figura 37	Expresión de CD163 en eventos CD172a ^{hi}	170
Figura 38	Expresión de TLR-4 en eventos CD172a ^{hi}	170
Figura 39	Expresión de Siglec-5 en eventos CD172a ^{hi}	171
Figura 40	Expresión de Siglec-10 en eventos CD172a ^l	172
Figura 41	Doble marcaje CD163 / TLR-2	174
Figura 42	Dot plots CD163 / TLR2	175
Figura 43	Dobles marcajes CD163 / Siglec-3	176
Figura 44	Dot plots CD163 / Siglec-3	177
Figura 45	Dobles marcajes CD163 / TLR-4	178
Figura 46	Expresión de CD163 en eventos TLR-2 ⁺	180
Figura 47	Dot plots CD163 / Siglec-1	180
Figura 48	Dobles marcajes con el anticuerpo monoclonal 6D10	182
Figura 49	Curvas de crecimiento de <i>Haemophilus parasuis</i> para estudio del transcriptoma	183
Figura 50	Integridad del ARN en muestras estudiadas	185
Figura 51	Genes y proteínas sobreexpresados en condiciones miméticas	188
Figura 52	Resumen de la sobreexpresión en condiciones miméticas	189
Figura 53	Genes y proteínas sobreexpresados en condiciones miméticas	194
Figura 54	Resumen de subexpresión en condiciones miméticas	196

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
CLR	<i>C-type lectin receptor</i> (receptor lecitina tipo-C)
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a daño)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (enzimoinmunoensayo)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (proteína quinasa regulada por señal extracelular)
Fhu	Ferric hydroxamate uptake (captador de hidroxamato férrico)
Fur	Ferric uptake regulador (regulador de la captación de hierro)
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i> (grupo caja 1 de alta movilidad)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor associated kinase-1</i> (quinasa asociada a receptor de IL1)
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i> (factor regulador de interferón 3)
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> (motivo activador de inmunoreceptores basado en tirosina)
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> (motivo inhibidor de inmunoreceptores basado en tirosina)
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> (c-jun amino-terminal quinasa)
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido
LRRs	<i>leucine-rich repeat</i> (<i>Repeticiones ricas en leucina</i>)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (proteína quinasa activada por mitógenos)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i> (factor de diferenciación mieloides 88)
NAD	Dinucleótido de adenine y nicotinamida
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
NK	<i>Natural Killer cells</i> (células asesinas naturales)
NLR	<i>NOD like receptor</i> (receptor tipo NOD)
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i> (dominio de oligomerización de unión a nucleótido)
OMP	<i>Outer membrane protein</i> (proteína de membrana externa)

PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a patógenos)
pb	Pares de bases
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (tampón fosfato)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PPLO	<i>Pleuro pneumonie like organisms</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> (receptor de reconocimiento de patrones)
PRRS	<i>Porcine reproductive and respiratory syndrome</i> (síndrome respiratorio y reproductivo porcino)
PTK	Protein tiroxin kinasa
PTP	Fosfotiroxin fosfatasa
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i> (gen I inducible por ácido retinoico)
RLR	<i>RIG-I Like Receptor</i> (receptor tipo RIG-I)
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut medium</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SHP	<i>homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
Siglec	<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins</i> (lectinas tipo inmunoglobulinas de unión a ácido siálico)
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i> (Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica)
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i> (adaptador conteniente de dominio TIR)
TLR	<i>Toll like receptor</i> (receptor tipo Toll)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i> (adaptador conteniente de dominio TIR inductor de interferón β)
UFC	Unidades formadoras de colonias

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD DE GLÄSSER

La enfermedad de Glässer es una patología infecciosa del ganado porcino causada por la bacteria *Haemophilus parasuis*, que cursa con un proceso séptico caracterizado por la producción de poliserositis, con presencia de abundantes copos de fibrina. En los últimos años ha ido en aumento su prevalencia fruto de la intensificación de la producción porcina, lo que está provocando importantes pérdidas económicas en el todo el sector a nivel mundial (Martín de la Fuente, 2007).

1.1.1. Breve historia de la enfermedad

En 1906, Karl Glässer describió una patología asociada a cerdos jóvenes que cursaba con poliserositis serofibrinosa, de ahí la denominación de la enfermedad (Turni *et al.*, 2010). El primer aislamiento del agente causal de la enfermedad de Glässer se atribuye a Schermer y Ehrlich, en 1922 (Oliveira & Pijoan, 2004), mientras que su primera caracterización fue realizada en 1931 por Lewis y Shope, quienes observaron que para su crecimiento necesitaba los factores V (NAD) y X (porfirina de hierro) por lo que lo adscribieron a la especie *Haemophilus suis*. Posteriormente, en 1969, Biberstein y White demostraron que el agente causal de esta enfermedad tan solo precisaba del factor V (NAD) por lo que se propuso el nombre de *Haemophilus parasuis*, debido a que el prefijo *-para* asignado al género *Haemophilus* implica necesidad de factor V (Oliveira & Pijoan, 2004).

1.1.2. Etiología

La enfermedad de Glässer está causada por cepas virulentas de la bacteria *H. parasuis* (Martín de la Fuente *et al.*, 2009). Estas bacterias se aíslan en la naturaleza de las vías respiratorias de *Sus scrofa*, que engloba cerdos domésticos y jabalíes, en los que se comporta como comensal y, ante ciertas circunstancias (ver después), sus cepas virulentas pueden causar la enfermedad de Glässer u otros tipos de infección (Aragón *et al.*, 2010; Hoefling, 1994).

1.1.2.1. Taxonomía

Taxonómicamente, se engloba en el género *Haemophilus*, de la familia *Pasteurellaceae* (Tabla 1) (Oliveira & Pijoan, 2004). A este género se adscriben también destacados patógenos humanos, como *H. influenzae* (Langereis & de Jonge, 2015) o *H. ducreyi* (Gonzalez-Beiras *et al.*, 2016).

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	γ -proteobacteria
Orden	<i>Pasteurellales</i>
Familia	<i>Pasteurellaceae</i>
Género	<i>Haemophilus</i>
Especie	<i>Haemophilus parasuis</i>

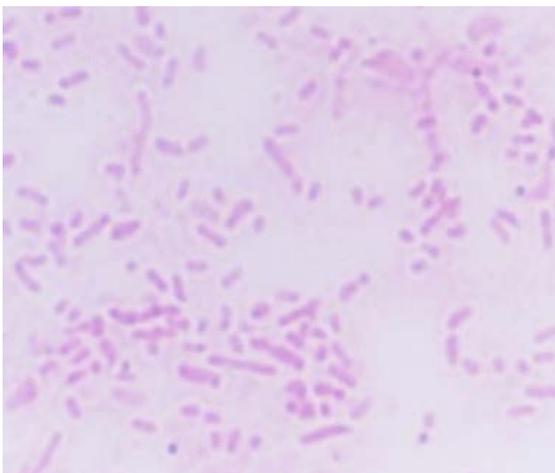
Tabla 1: Clasificación taxonómica de *H. parasuis*.

1.1.2.2. Morfología

Macroscópicamente, tras 48 horas de incubación en el medio adecuado, sus colonias son de pequeño tamaño, translúcidas y con aspecto de “gotas de rocío” (Imagen 2) (Quinn *et al.*, 2011). Microscópicamente, son bacterias Gram negativas, inmóviles que, al ser pleomórficas, pueden poseer la apariencia de bacilos o cocobacilos. En función de la cepa, pueden presentar o no cápsula; aquellas cepas no capsuladas tienden a tener una apariencia de bacilos (Imagen 1) con una proporción ancho/largo variable, desde barra a filamento. Por el contrario, entre las cepas capsuladas tienden a ser cocobacilos (Morozumi & Nicolet, 1986).



Microscopía electrónica de barrido en la que se observan bacterias de la cepa Nagasaki de *H. parasuis* sobre células epiteliales renales porcinas de la línea PK-15 (Frاندoloso *et al.*, 2012).



Tinción Gram sobre la cepa Nagasaki de *H. parasuis* observada con microscopio óptico a 1000 aumentos (Fuente departamento sanidad animal).

Imagen 1: Apariencia microscópica de *H. parasuis*

1.1.2.3. Cultivo

El cultivo de *H. parasuis* resulta relativamente complicado, debido a que presenta un crecimiento lento y ciertas necesidades especiales, como el factor V de coagulación de la sangre (dinucleótido de nicotamida y adenina, NAD), lo cual dificulta su aislamiento a partir de muestras clínicas. Para su cultivo en placa, el medio de elección es el agar chocolate. Este medio incorpora en su formulación sangre de oveja o de caballo, que, tras ser lisada mediante tratamiento térmico, libera el contenido de los eritrocitos, lo que constituye una fuente de NAD para la bacteria.

Como alternativa, se pueden utilizar medios como el agar sangre o el agar PPLO (*Pleuropneumonia-like organism*) suplementados con NAD. Asimismo, podemos observar el crecimiento de *H. parasuis* en forma de colonias satélites en torno a una estría nodriza de *Staphylococcus aureus* o *S Staphylococcus epidermidis* en agar sangre, gracias

a que estas especies producen NAD soluble. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y la atmósfera de microaerofilia (5% de CO₂). Para su cultivo en medio líquido una buena alternativa la constituye el caldo PPLO enriquecido con NAD y glucosa (Oliveira, 2007; Rodríguez Ferri *et al.*, 2000).

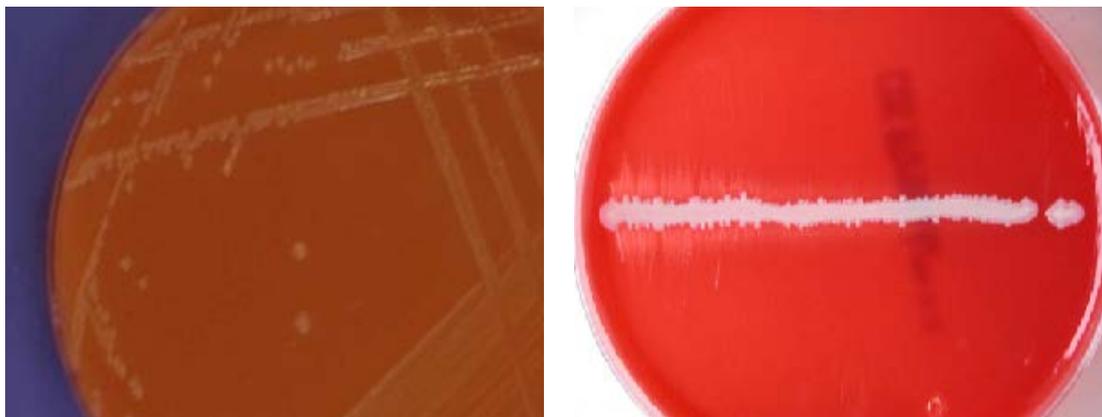


Imagen 2: Apariencia macroscópica de *H. parasuis*. A la izquierda, colonias aisladas de *H. parasuis* tras su cultivo en agar chocolate. A la derecha colonias astérites de *H. parasuis* entorno a una estría nodriza de *S. aureus* en una placa de agar sangre (Fuente departamento de Sanidad Animal).

1.1.2.4. Serotipado

El número de serotipos descritos ha ido incrementándose durante la segunda mitad del siglo XX, pasando de los cuatro iniciales descritos en 1952 a los 15 actuales establecidos en 1992 mediante inmunodifusión al enfrentar anti-sueros de conejos a antígenos termoestables y resistentes a enzimas proteolíticas (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992). Sin embargo, mediante esta técnica un porcentaje importante de cepas eran descritas como no tipables, al no poder ser adscritas a ninguno de los serotipos conocidos. Una nueva metodología desarrollada en paralelo por un grupo canadiense (Tadjine *et al.*, 2004) y por nuestro grupo de investigación (Del Río *et al.*, 2003) basada en la hemaglutinación indirecta, permitió reducir considerablemente el número de cepas no serotipables, aunque no las eliminó por completo (Oliveira, 2007), además de disminuir el número de reacciones cruzadas.

Recientemente (Howell *et al.*, 2015) se ha desarrollado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex que permite, mediante el uso de 15 pares de cebadores, asignar las cepas a su serotipo correspondiente sin la necesidad de recurrir a procedimientos serológicos. Esta nueva técnica es más rápida, barata y específica que la

hemaglutinación indirecta, aunque presenta como principal inconveniente el no poder diferenciar entre los serotipos 5 y 12 debido a que el producto de la amplificación para ellos es muy similar.

La importancia del serotipo, además de las relaciones de protección cruzada que puedan producirse entre ellos desde un punto de vista inmunológico, radica en que se viene utilizando como factor indicador de virulencia (Oliveira & Pijoan, 2004). Sin embargo, hay que tener en cuenta que, como acaba de mencionarse, muchas cepas no son tipables.

Para cada serotipo se ha establecido una cepa de referencia (Tabla 2). En un estudio llevado a cabo por Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992) se estudió el grado de virulencia de cada serotipo, empleando para ello sus cepas de referencia y/o cepas aisladas de campo, pertenecientes a un serotipo determinado, que fueron empleadas para realizar una inoculación intraperitoneal en cerdos SPF (libres de patógenos específicos, por sus siglas en inglés). Los serotipos 1, 5, 10, 12, 13 y 14 fueron clasificados como muy virulentos porque sus cepas provocaban la muerte, o un estado de máxima gravedad, en los primeros cuatro días post-infección. Los serotipos 2, 4 y 15, en cambio, fueron catalogados como moderadamente virulentos porque se observó que sus cepas inducían la aparición de poliserositis pero sin evolucionar a un desenlace fatal. La cepa de referencia del serotipo 8 solo fue capaz de producir una sintomatología leve por lo que su serotipo fue considerado como levemente virulento. Por último, los serotipos 3, 6, 7, 9 y 11 fueron clasificados como avirulentos, porque no fueron capaces de desencadenar signos clínicos ni lesiones importantes.

Serotipo	Cepa	País de origen	Lugar de aislamiento	Sintomatología	Virulencia
1	No. 4	Japón	Cavidad nasal	Sano	Elevada
2	SW140	Japón	Cavidad nasal	Sano	Moderada
3	SW114	Japón	Cavidad nasal	Sano	Avirulenta
4	SW124	Japón	Cavidad nasal	Sano	Moderada
5	Nagasaki	Japón	Meninges	Septicemia	Elevada
6	131	Suiza	Cavidad nasal	Sano	Avirulenta
7	174	Suiza	Cavidad nasal	Sano	Avirulenta
8	C5	Suecia	Desconocido	Desconocido	Leve
9	D74	Suecia	Desconocido	Desconocido	Avirulenta
10	H555	Alemania	Cavidad nasal	Sano	Elevada
11	H465	Alemania	Tráquea	Neumonía	Avirulenta
12	H425	Alemania	Pulmón	Poliserositis	Elevada
13	84-17975	EEUU	Pulmón	Desconocido	Elevada
14	84-22113	EEUU	Articulación	Desconocido	Elevada
15	84-15995	EEUU	Pulmón	Neumonía	Moderada

Tabla 2: Cepas de referencia para cada serotipo de *H. parasuis*. Se indica el país de origen, su lugar corporal de aislamiento, la sintomatología del animal de donde fue aislado y su grado de virulencia (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992; Zehr *et al.*, 2012).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que dentro de algunos serotipos se han descrito tanto cepas virulentas como avirulentas (Lawrence *et al.*, 2014), por lo que la vinculación que se puede establecer en esta especie entre el serotipo y el grado de virulencia no es tan determinante como sucede en otro patógeno porcino de la misma familia, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en el que la dotación de hemolisinas que contiene cada serotipo, unido al lipopolisacárido de la membrana externa, vinculan un determinado grado de virulencia con un serotipo concreto (Tascon *et al.*, 1994).

1.1.2.5. Tipado mediante el perfil de las proteínas de la membrana externa

Mediante la realización de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), sobre extractos de proteínas de la membrana externa, se han descrito dos perfiles, en función de los patrones de bandas proteicas. Entre las cepas aisladas en las vías aéreas de los animales sanos se podían encontrar ambos perfiles. Por el contrario, las cepas aisladas de localizaciones extra-respiratorias de los animales afectados por la enfermedad de Glässer presentaban el mismo perfil. Por ello, se asumió que ese perfil era propio de cepas virulentas (Ruiz *et al.*, 2001).

1.1.2.6. Tipado mediante procedimientos con ADN

En las tres últimas décadas se han ido aplicando diferentes técnicas moleculares sobre el ADN de *H. parasuis* en un intento de obtener nuevos sistemas de clasificación, que evitaran los problemas asociados a la clasificación mediante serotipos, como es el caso de las reacciones cruzadas o de las cepas no tipables (Oliveira & Pijoan, 2004).

Smart *et al.* (1993) aplicaron la “huella dactilar” mediante enzimas de restricción a un conjunto de aislados de la bacteria y observaron que aproximadamente un tercio de ellos mostraban un perfil único, mientras que los dos tercios restantes se podían englobar en 13 perfiles diferentes. Además, observaron que los perfiles de cepas aisladas en localizaciones sistémicas (virulentas) presentaban un amplio grado de similitud, a la vez que resultaban diferentes de los aislados obtenidos en la cavidad nasal de cerdos sanos, aunque se tratara de animales procedentes de la misma explotación.

Blackall *et al.* (1997) estudiaron por medio de electroforesis (*Multilocus enzyme electrophoresis*) los enzimas intracelulares de *H. parasuis*. Demostraron que los perfiles detectados permitían agrupar esta especie en dos grandes grupos, pero, no lograron establecer una relación consistente entre la pertenencia a uno de esos grupos y el lugar de aislamiento de la cepa o, lo que es lo mismo, su virulencia.

Aplicando PCR sobre secuencias intergénicas repetitivas de consenso (ERIC) se consiguió obtener diferentes perfiles, en función de los patrones de bandas observados mediante electroforesis. Este método parece ser más discriminatorio que el serotipado, puesto que dentro de un mismo serotipo se pueden observar cepas con diferentes perfiles (Oliveira *et al.*, 2003).

Otro método de tipado, desarrollado por nuestro grupo de investigación, recurre al estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) sobre el gen *tbpA* previamente amplificado por PCR. Las 15 cepas de referencia de los serotipos mostraron 12 patrones PCR-RFLP, debido a que los serotipos 5, 12, 14 y 15 presentaban el mismo patrón. Aplicando esta técnica sobre un gran número de aislados de campo se encontraron 23 nuevos patrones; sin embargo, tras comparar resultados de PCR-RFLP con serotipado, no se pudo establecer una correlación entre el serotipo y el patrón de PCR-RFLP (de la Puente Redondo *et al.*, 2003). Sobre esta metodología, las universidades de León y Cantabria desarrollaron una patente.

Como ya hemos mencionado previamente, se ha conseguido desarrollar un método que permite “serotipar” mediante la aplicación de una PCR multiplex con la excepción de los serotipos 5 y 12 (Howell *et al.*, 2015).

Muy recientemente, se han desarrollado tres métodos que utilizan PCRs multiplex con un elevado poder de discriminación entre las cepas virulentas y avirulentas. En uno de ellos (Howell *et al.*, 2017), tras un amplio estudio comparativo del genoma de las cepas aisladas de vías aéreas y de las obtenidas de localizaciones sistémicas, se seleccionaron 11 genes que podrían servir como indicadores de virulencia. A partir de ellos se diseñó una PCR multiplex que, al ser aplicada sobre una cepa particular, se le asigna una puntuación en función del perfil de bandas obtenido tras una electroforesis y, en caso de sobrepasar un umbral preestablecido, se considera como una cepa virulenta. Los otros dos métodos, mucho más sencillos en su ejecución, se basaron en la amplificación de genes *vtaA*, que codifican unas proteínas conocidas como autotransportadores asociados a virulencia. Estas proteínas se clasifican en tres grupos, el tercero se encuentra en todas las cepas, mientras que el primero se asocia con cepas virulentas. Mediante una PCR multiplex que permitía la amplificación de una secuencia del grupo 1 y otra del grupo 3 (Olvera *et al.*, 2012), se consiguió distinguir entre cepas virulentas y avirulentas, en función de la capacidad de amplificación de la secuencia específica del grupo 3. Sin embargo, este procedimiento presentaba una serie de limitaciones técnicas que complicaban su aplicación, por lo que los mismos autores (Galofre-Mila *et al.*, 2017), basándose en la secuencia líder común a los genes *vtaA*, desarrollaron una nueva PCR multiplex que, utilizando tan solo tres cebadores, permite la diferenciación entre cepas virulentas y avirulentas, según el tamaño del amplicón resultante.

1.1.3. Epidemiología

H. parasuis está ampliamente distribuido por todo el mundo. Además, la prevalencia de la enfermedad de Glässer ha ido aumentando progresivamente en los últimos años debido a la intensificación sufrida por los sistemas de producción porcina; de hecho, *H. parasuis* y *Streptococcus suis* son los principales patógenos bacterianos a nivel mundial en lo que a porcentaje de muerte de lechones destetados se refiere (Gottschalk, 2011). Con respecto al serotipo de las cepas recuperadas a partir de casos clínicos, en Japón, Alemania, sur de China y España los más prevalentes fueron el 4 y el 5. En el caso de Australia, el 5 y 13; en los Estados Unidos y Brasil, el 4 seguido a escasa distancia del conjunto de cepas no tipables (Macêdo *et al.*, 2009; Oliveira & Pijoan, 2004; Zhang *et al.*, 2012e).

H. parasuis se puede transmitir de forma vertical entre madre y lechón durante la lactancia, o de forma horizontal, dentro de la piara. Además, el contagio puede tener lugar por contacto directo o indirectamente por vía aerógena, como también a través de diversos fómites (Frاندoloso *et al.*, 2011a).

La enfermedad de Glässer puede presentarse de dos formas, en función del *status* sanitario de la explotación en la que ocurra el brote. En el caso de granjas convencionales, *H. parasuis* suele encontrarse formando parte de la *microbiota* de las vías aéreas superiores, produciéndose su colonización en una etapa temprana de la vida por contacto directo entre el lechón y la madre, la cual además también trasmite a la descendencia la inmunidad pasiva, a través del calostro lo que mantiene al animal protegido, ya que debido a la presentación de una placenta epiteliocorial en esta especie animal, resulta imposible el paso de inmunoglobulinas, ni siquiera de las de menor tamaño, durante la vida fetal. En estas explotaciones, ante ciertas circunstancias asociadas a situaciones de estrés (mezcla de animales de distintas edades y procedencias, destete precoz, hacinamiento, condiciones higiénicas deficientes, bajada brusca de temperatura, etc...), las cepas virulentas pueden sobrepasar las defensas del hospedador y provocar la enfermedad (Smart *et al.*, 1989). Podríamos hablar por lo tanto de una presentación endémica de la enfermedad de Glässer.

En las explotaciones con un elevado *status* sanitario, en las que no circule la bacteria y no se vacune, los cerdos pueden verse gravemente afectados si se logra introducir una cepa virulenta, por ejemplo, con la incorporación de nuevos animales que

sean portadores, debido a que no tendrán ningún tipo de inmunidad frente a ella (Smart *et al.*, 1989). Se hablaría entonces de una presentación epidémica de la enfermedad de Glässer.

Además de producir la enfermedad de Glässer, este microorganismo también puede formar parte del complejo respiratorio porcino (Brockmeier *et al.*, 2002), participando en procesos respiratorios como la neumonía, aunque en este caso suele desempeñar un papel de agente secundario a otros patógenos primarios (Hoefling, 1994), concediéndose además una especial relevancia a la asociación con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) (Martínez-Martínez. S, 2011).

Con respecto a la importancia relativa de los jabalíes como reservorios de *H. parasuis*, partiendo de piezas de caza cobradas en Alemania durante la primera década del siglo XXI, se pudo observar que la prevalencia relativa de *H. parasuis* en ellas era del 74,2% (Reiner *et al.*, 2010). Se trata además de la primera descripción de esta bacteria Gram negativa en esta especie salvaje.

1.1.4. Patogenia

H. parasuis se localiza en las vías aéreas superiores y, en el caso de pertenecer a una cepa virulenta, si encuentra las condiciones necesarias que hemos relatado anteriormente, puede invadir el organismo del hospedador y diseminarse por diferentes órganos y tejidos, hasta desarrollar la enfermedad de Glässer.

1.1.4.1. Evasión del sistema inmunitario en el aparato respiratorio

La mucosa que tapiza las vías respiratorias constituye la primera línea defensiva del sistema inmunitario para evitar la entrada de patógenos, dentro de la primera categoría de “barreras físicas y mecanismos mecánicos”. Las IgAs ejercen un papel fundamental en la defensa de esta mucosa (Zhang *et al.*, 2014). Estos anticuerpos son producidos por células plasmáticas de la submucosa y posteriormente transportados, gracias al componente secretor, a través del epitelio para ser liberados en su superficie (Snoeck *et al.*, 2006), en donde bloquea la adhesión de los patógenos a la mucosa e interviene en la retención de los mismos en el moco (Zhang *et al.*, 2014).

Una estrategia desarrollada por las bacterias patógenas para burlar este sistema de defensa consiste en el empleo de enzimas proteasas, capaces de degradar estas inmunoglobulinas, habiéndose descrito varias en *H. influenzae*. Esta actividad constituye

un factor de virulencia de primera magnitud. En el caso de *H. parasuis*, aunque se ha observado su actividad proteolítica sobre las IgAs porcinas, todavía no se ha encontrado la o las enzimas responsables de ella (Zhang *et al.*, 2014), aunque se sospecha que una de las implicadas podría ser la serin-proteasa espP2 (Costa-Hurtado & Aragón, 2013).

Bello-Orti *et al.* (2014) observaron que la formación de *biofilms* era más destacada en cepas avirulentas que en virulentas. Esta circunstancia les llevó a proponer que el estado planctónico, más común entre las cepas virulentas, podría ser uno de los factores que desencadenara la diseminación e invasión del hospedador, mientras que el estado de *biofilm*, más relevante en las cepas avirulentas, les permitiría la colonización y persistencia en la porción superior de las vías respiratorias.

Al diseminarse las cepas virulentas a partir de la porción superior de las vías respiratoria, pueden alcanzar los pulmones, donde los macrófagos alveolares desempeñan un papel crucial dentro del sistema inmunitario, al fagocitar los agentes patógenos y regular la inflamación mediante la liberación de citoquinas (Zhang *et al.*, 2014). Olvera *et al.* (2009) observaron que las cepas provenientes de localizaciones sistémicas durante la enfermedad y, por lo tanto, consideradas virulentas, eran capaces de resistir la fagocitosis ejercida por los macrófagos alveolares. Independientemente de su resistencia a la fagocitosis, la interacción entre la bacteria y las células del sistema inmunitario desencadena la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias que resultan determinantes en la aparición de las lesiones pulmonares (Zhang *et al.*, 2014).

Como hemos mencionado previamente con respecto al papel de *H. parasuis* como agente causante de neumonías conviene aclarar que, aunque experimentalmente con dosis altas de cepas virulentas administradas por vía intratraqueal se puede conseguir provocar una neumonía a la par que una septicemia, en el caso de la infección natural es difícil hallar a *H. parasuis* como agente etiológico único de una neumonía, desempeñando normalmente un papel de agente secundario a otros patógenos respiratorios concomitantes (Amano *et al.*, 1997).

1.1.4.2. Acceso a la circulación sanguínea y diseminación de la bacteria por el organismo

Tras evadir el sistema inmunitario innato, tanto de las vías respiratorias superiores como de los pulmones, *H. parasuis* accede al torrente sanguíneo (Zhang *et al.*, 2014). No se conoce exactamente el mecanismo mediante el que este microorganismo es capaz de alcanzar la circulación, aunque se ha descrito que algunas cepas virulentas son capaces de adherirse e invadir diferentes tipos de células epiteliales, además de inducir apoptosis en células epiteliales de la tráquea. Por lo tanto, la adhesión, la invasión y la rotura de la mucosa parecen convertirse en procesos importantes en las primeras fases de la infección (Costa-Hurtado & Aragón, 2013).

Las cepas virulentas de *H. parasuis* son capaces de resistir la acción bactericida del suero dependiente del sistema del complemento (Cerdeja-Cuellar & Aragón, 2008), hecho que les permite sobrevivir en el torrente sanguíneo y diseminarse por el organismo para alcanzar nuevos órganos y sistemas. Además, la endotoxina (lípidos A del lipooligosacárido de la membrana externa) de *H. parasuis* produce coagulación intravascular diseminada que induce la formación de microtrombos en diferentes órganos (Amano *et al.*, 1997).

1.1.4.3. Invasión de órganos y de cavidades corporales

H. parasuis es capaz de adherirse e invadir células del endotelio vascular, a partir de lo cual se encontraría en condiciones de colonizar nuevos órganos, las membranas serosas (pleura, pericardio y peritoneo), las meninges y las articulaciones. Dicha capacidad de invasión del endotelio ha sido demostrada en diferentes estudios llevados a cabo en células porcinas del endotelio de la vena umbilical o en células porcinas del endotelio microvascular del cerebro (Zhang *et al.*, 2014).

Dentro de las lesiones comunes de la enfermedad de Glässer se encuentran las poliserositis fibrinosas o fibrinopurulentas (Martín de la Fuente *et al.*, 2009). Como las membranas serosas presentan una gran vascularización, son fácilmente accesibles a *H. parasuis* y cuando éste invade las membranas, se produce inflamación, con extravasación de contenido seroso al interior de las cavidades que recubren. Paralelamente, la alteración del epitelio de las membranas desencadena la entrada de plasma, con el consiguiente depósito de fibrina; se habla entonces de un derrame fibrinoso. Si además aparecen bacterias y células inflamatorias, pasaría a denominarse derrame fibrinopurulento.

1.1.4.4. Factores de virulencia

1.1.4.4.1. Proteína de la membrana externa P2 (OMP-P2)

La OMP P2 es una porina y constituye la proteína más abundante en la membrana externa (Zhang *et al.*, 2014). Diferentes estudios han demostrado su intervención en la capacidad para resistir la acción bactericida del suero dependiente del sistema del complemento (Zhou *et al.*, 2013), en la adhesión a macrófagos alveolares (Zhang *et al.*, 2012c), o en la captación de algunos elementos importantes para el crecimiento bacteriano (Zhang *et al.*, 2012a).

1.1.4.4.2. Lipooligosacárido (LOS)

A diferencia de otras bacterias Gram negativas, las pertenecientes a algunos géneros, como *Haemophilus*, *Neisseria* o *Campylobacter*, presentan su superficie recubierta de lipooligosacárido (LOS), una variante del lipopolisacárido en la que faltan total o parcialmente las repeticiones de antígeno O que forma las cadenas laterales, manteniendo el lípido A y el núcleo o “core” del oligosacárido (Preston *et al.*, 1996).

Los LOSs de *H. parasuis* presentan la misma actividad endotóxica que los LPSs de otras bacterias Gram negativas (no en vano esta acción recae en la porción más común de la molécula: el lípido A), lo que agrava los síntomas clínicos y puede desencadenar un choque endotóxico. Además, también se ha descrito la intervención de los LOSs de esta bacteria en la adherencia, invasión y resistencia de la actividad bactericida del suero (Zhang *et al.*, 2014), al igual que en otras muchas bacterias Gram negativas.

1.1.4.4.3. Recubrimiento por ácido siálico de los lipooligosacáridos (LOS)

Ciertos patógenos poseen la capacidad de incorporar ácido siálico a su superficie en un intento de mimetizarse con el hospedador y así poder evitar la respuesta inmunitaria, en este caso del cerdo. El ácido siálico recubre la superficie de las células propias del hospedador y regula negativamente el sistema inmune (Chang & Nizet, 2014). En el caso de *H. parasuis*, se ha observado que algunas cepas virulentas, como la Nagasaki, cuentan con la capacidad de transferir ácido siálico a sus LOSs, a diferencia de otras cepas no virulentas, como la SW114 (Martinez-Moliner *et al.*, 2012). Los hallazgos con respecto al recubrimiento de *H. parasuis* con ácido siálico se describen con mayor extensión más adelante.

1.1.4.4.4. Cápsula

No existe una asociación clara entre la producción de cápsula y virulencia; no obstante, se ha descrito que cuando se incuban cepas virulentas en presencia de macrófagos alveolares porcinos desarrollan una cápsula diferente, por lo que la cápsula podría intervenir en la resistencia a la fagocitosis observada en dichas cepas (Costa-Hurtado & Aragón, 2013). La proteína CapD, encargada de la síntesis de polisacáridos (Wang *et al.*, 2013), y las proteínas GalU y GalE, responsables de la síntesis de UDP-glucosa y de su conversión en UDP-galactosa (Zhang *et al.*, 2014), podrían intervenir, entre otras funciones, en la producción de la cápsula.

1.1.4.4.5. ¿Hemolisinas?

Mediante cultivo *in vitro* no ha resultado posible la demostración de la presencia de hemolisinas en *H. parasuis*. Sin embargo, Sack & Baltes (2009) observaron que algunas cepas virulentas presentaban el operón *hhdBA*, similar al presente en *H. ducreyi*, cuyos genes *hhdB* y *hhdA* codifican la proteína de activación/secreción HhdB y la hemolisina HhdA (Palmer *et al.*, 1998). Posteriormente, Assavacheep *et al.* (2012) observaron en un estudio sobre una colección de aislados procedentes tanto de la cavidad nasal (avirulentos) como de localizaciones sistémicas (virulentos), que este operón no se encontraba en ninguno de los aislados recuperados a partir de la cavidad nasal, aunque tampoco estaba presente en todos los aislados sistémicos. Un nuevo estudio llevado a cabo por Lawrence & Bey (2015) sobre el genoma de varias cepas de los serotipos 4 y 5 detectó otros cinco nuevos genes que podrían codificar otras hemolisinas.

Sin embargo, como se ha dicho previamente, por cultivo *in vitro* no se ha podido demostrar la presencia de hemolisinas en *H. parasuis*, lo que sigue representando una diferencia fenotípica importante a la hora de diferenciarlo del agente responsable de la pleuroneumonía porcina, *A. pleuropneumoniae*, igual que ocurre con la reacción o fenómeno CAMP.

1.1.4.4.6. Autotransportadores triméricos asociados a la virulencia (VtaAs)

Los VtaAs son autotransportadores triméricos anclados mediante un barril β a la membrana externa, que presentan dominios relacionados con la adhesión. Cada cepa de *H. parasuis* presenta hasta diez tipos de estas proteínas, que se dividen en tres grupos (1, 2 y 3) en función de su dominio translocador (Pina *et al.*, 2009). El grupo 3 parece estar presente en todas las cepas de la especie, mientras que los otros dos grupos se asocian con cepas procedentes de aislados de origen sistémico (virulentos). Se ha establecido una relación entre los VtaAs pertenecientes al grupo 1 y la resistencia a la fagocitosis. De hecho, se ha diseñado una PCR multiplex que permite la diferenciación de las cepas virulentas de las no virulentas (como ya se comentó con anterioridad), utilizando tres cebadores que hibridan con la secuencia líder de los genes que codifican estas proteínas (Galofre-Mila *et al.*, 2017).

1.1.4.4.7. Fimbrias

Munch *et al.* (1992) observaron mediante microscopía electrónica que, durante la infección, *H. parasuis* mostraba estructuras de tipo fimbrias. Xu *et al.* (2011) detectaron en la cepa virulenta SH0165 el operón *pilABCD*, capaz de codificar las fimbrias de tipo IV. Las fimbrias poseen como función la mediación en la adhesión al epitelio de las mucosas porcinas (Xu *et al.*, 2011).

1.1.4.4.8. Toxinas de distensión citoletales (CDTs)

Este sistema de toxinas se encuentra presente en diferentes bacterias patógenas Gram negativas. Las CDTs son un complejo de tres proteínas (CdtA, CdtB y CdtC), de las cuales la primera y la última intervienen en la unión a la superficie celular, lo que permite la liberación en su interior de CdtB, que daña el ADN de la célula, de forma que queda detenido el ciclo celular pudiendo producir su muerte. Además, también se ha descrito su papel como mediadoras en la adhesión e invasión, así como en la inducción de la producción de citoquinas (Zhang *et al.*, 2014).

En el caso de *H. parasuis*, se ha detectado la presencia de los genes que codifican estas proteínas, con dos copias de cada uno (Yue *et al.*, 2009) y se ha observado que CdtB es suficiente para inducir la detención del ciclo celular en las líneas celulares PK-15 (línea de células porcinas del epitelio renal) (Zhou *et al.*, 2012). Mediante estudios de deleciones en estos genes, se demostró su papel en la adhesión, invasión y resistencia al suero, debido

a que las bacterias mutantes veían disminuidas estas tres capacidades (Zhang *et al.*, 2012b).

1.1.4.4.9. Captación por la bacteria de hierro del hospedador

El hierro constituye un oligoelemento esencial para la gran mayoría de los microorganismos, ya que interviene en las reacciones redox, entre otras funciones. Sin embargo, su concentración óptima para el crecimiento bacteriano es mucho mayor que la existente de forma disponible en el ambiente del interior de los mamíferos, ya que este metal se halla secuestrado de diversas formas para satisfacer las necesidades del propio hospedador. Además, durante la infección, el organismo del hospedador responde limitando aún más la cantidad de hierro disponible, por medio del incremento del almacenaje de hierro en el interior de las células, la disminución de la cantidad de hierro liberado a la circulación y la disminución de la biodisponibilidad extracelular del hierro, tanto libre como formando parte de diversos complejos proteicos (Parrow *et al.*, 2013).

Todas estas circunstancias han determinado que las bacterias patógenas se hayan visto obligadas a tener que desarrollar diferentes mecanismos, encaminados a la sustracción de hierro del hospedador, los cuales, en general, se basan en proteínas de membrana y/o secretadas (Parrow *et al.*, 2013).

Dentro de estos mecanismos nos podemos encontrar a aquellos basados en sideróforos, los cuales son compuestos tipo catecoles o tipo hidroxamatos que son secretados al exterior para unirse a hierro libre o hierro unido a proteínas del hospedador. Posteriormente, el complejo hierro-sideróforo es reconocido e internalizado por un receptor de membrana. En *H. parasuis* se ha caracterizado un sistema de captación de hierro mediante un sideróforo de tipo hidroxamato (del Río *et al.*, 2006).

Un sistema similar al anterior, pero en este caso destinado a captar grupos hemo, es el de los hemóforos, que son proteínas secretadas al exterior mediante un transportador, desde donde son capaces de unirse a grupos hemo libres o a grupos hemo previamente unidos a la hemopexina del hospedador. Consiguen así la captación, para que finalmente un receptor de membrana reconozca y sitúe en el interior de la bacteria el complejo hemóforo-grupo hemo. En el caso de *H. parasuis*, se ha descrito un operon *hxuABC*, que contiene los genes *hxuA*, *hxuB* y *hxuC*, que codifican el hemóforo (conocido como proteína de unión a hemo/hemopexina), transportador y receptor, respectivamente (Wen

et al., 2016). Este sistema ha sido descrito previamente como factor de virulencia en *H. influenzae* (Morton *et al.*, 2007).

Otro sistema de gran importancia, no solo dentro de otros integrantes de la familia *Pasteurellaceae* sino también de la familia *Neisseriaceae*, lo constituyen las proteínas de la membrana externa capaces de reconocer y unirse a las proteínas del hospedador portadoras de hierro. Entre ellas, pueden destacarse las proteínas de unión a la transferrina (TbpA y TbpB), que han sido estudiadas con profusión durante los últimos años por nuestro grupo de investigación en *H. parasuis* (Frاندoloso *et al.*, 2011b).

1.1.5 Cuadro clínico y lesiones

Hoefling (1994) describió tres formas clínicas provocadas por la infección de *H. parasuis* como agente primario. La principal es una septicemia con poliserositis fibrinopurulentas, es decir, la enfermedad de Glässer propiamente dicha. Además de ésta, también puede aparecer en algunos casos una septicemia aguda sin presencia de poliserositis o una miositis en los músculos maseteros.

H. parasuis también puede actuar como un agente secundario en neumonías causadas por otros patógenos primarios, tanto víricos como bacterianos (Hoefling, 1994), dentro del conocido como “Complejo Respiratorio Porcino” (Brockmeier *et al.*, 2002).

La enfermedad de Glässer cursa con un cuadro séptico y su aparición suele ser repentina, afectando principalmente a animales jóvenes de entre 5 y 12 semanas, si bien puede afectar a cerdos de todas las edades (Zimmerman *et al.*, 2012). Cursa con síntomas iniciales completamente inespecíficos, como hipertermia, apatía y falta de apetito, que irán evolucionando en gravedad conforme se va instalando el cuadro séptico, además de presentarse otros nuevos, en función de las localizaciones corporales afectadas. Estos últimos, que a continuación relataremos, si bien son propios de la enfermedad y ayudan a orientar la sospecha inicial, no resultan en absoluto patognomónicos, puesto que pueden ser ocasionados por otros microorganismos patógenos (Nedbalcova *et al.*, 2006).

En caso de afectación de las meninges se observarán síntomas nerviosos como temblores, incoordinación de movimientos, paresia del tercio posterior y/o postración lateral. Si la infección afecta a las cavidades articulares aparecerán cojeras, pudiendo además resultar evidente la inflamación de la articulación afectada. También podría aparecer una sintomatología respiratoria con disnea y/o descarga nasal. Esta serie de

síntomas nerviosos, motores y/o respiratorios no tienen por qué coincidir en un mismo animal, sino que más bien su aparición dependerá del grado de afectación de la localización determinada (Zimmerman *et al.*, 2012).

La evolución del cuadro clínico dependerá del grado de virulencia de la cepa (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992); en caso de tratarse de una cepa de gran virulencia y no recibir tratamiento, se desencadenará un elevado porcentaje de mortalidad, debido a la instauración de la sepsis. Por lo general, sin embargo, la morbilidad no suele ser muy elevada, salvo en el caso de que el brote se produzca en una explotación sin contacto previo con la bacteria, donde se haya introducido una cepa virulenta (Zimmerman *et al.*, 2012).

Con respecto a las lesiones observadas en animales afectados por la enfermedad de Glässer resulta característica, aunque nuevamente no patognomónica, la presencia de exudados con diferentes grados de depósitos de fibrina sobre la superficie de paredes y órganos de diversas cavidades corporales, como la pericárdica, torácica, abdominal, craneal o articular. Además, también es posible observar microtrombos en riñón, pulmón o cerebro, debido a un choque endotóxico (Amano *et al.*, 1997). Por el contrario, la presencia de áreas de consolidación neumónicas no suele constituir un hallazgo macroscópico común en la enfermedad de Glässer (Amano *et al.*, 1997).

1.1.6. Diagnóstico

1.1.6.1. Diagnóstico de presunción

La similitud existente entre *H. parasuis* y otras bacterias patógenas porcinas (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* o *Mycoplasma hyorhinis*), tanto con respecto a la sintomatología como a las lesiones *postmortem*, obligan a que el diagnóstico presuntivo deba apoyarse en un diagnóstico correcto diferencial en el laboratorio mediante el aislamiento e identificación bacteriana (Kang *et al.*, 2012; Nedbalcova *et al.*, 2006).

1.1.6.2. Muestreo y aislamiento

El diagnóstico laboratorial correcto de la enfermedad de Glässer se basa en el aislamiento de la bacteria *H. parasuis* a partir de lesiones *post-mortem* en localizaciones que impliquen una diseminación sistémica, como por ejemplo las meninges, cavidades

serosas y articulaciones. Una buena opción es utilizar hisopos sobre la superficie de órganos o cavidades donde se haya encontrado exudado fibrinoso. Otra buena opción es el empleo de jeringas estériles para recoger fluido de las cavidades torácica, pericárdica, peritoneal y/o articulares (carpo y tarso). Como en ocasiones se pueden aislar diferentes cepas en distintos puntos del cuerpo de un mismo cerdo, lo ideal sería muestrear diferentes localizaciones (Oliveira, 2004).

El muestreo del aparato respiratorio debe de quedar descartado debido a que, al formar parte *H. parasuis* de la microbiota de las vías aéreas, el aislamiento de la bacteria a partir de cavidad nasal, tráquea o pulmón, no tiene porqué implicar que sea el agente patógeno implicado en el proceso infeccioso a diagnosticar (Oliveira & Pijoan, 2002). Solo en caso de realizar estudios epidemiológicos sobre animales sanos o en el contexto del complejo respiratorio porcino deberemos recurrir a la cavidad nasal o pulmón respectivamente.

La recuperación de la bacteria a partir de animales que lleven tiempo muertos es a menudo complicada, por lo que la condición ideal viene representada por la eutanasia de un cerdo que presente una sintomatología clínica propia de una infección aguda, del tipo nervioso, respiratorio y/o articular. Además, resulta importante que el animal seleccionado no haya recibido tratamiento antibiótico (Oliveira, 2004).

Un problema asociado al aislamiento de la bacteria es que presenta un crecimiento lento, con necesidades de cultivo especiales, lo que sumado al hecho de que las condiciones de muestreo en campo no suelen ser asépticas causa que con facilidad aparezcan contaminaciones bacterianas que puedan interferir y hasta enmascarar el propio crecimiento de *H. parasuis* (Oliveira *et al.*, 2001). Por esta razón hay que extremar, en la medida de lo posible, las condiciones de esterilidad durante la toma y transporte de las muestras. Por tanto, se aconseja su mantenimiento en condiciones de refrigeración, así como la utilización de los medios de transporte adecuados. El medio de cultivo de Amies, suplementado con carbón (charcoal), parece mantener mejor la viabilidad de la bacteria que el de Stuart (Oliveira, 2004).

1.1.6.3. Identificación

Una vez obtenidos cultivos puros, cuya morfología macroscópica y microscópica coincidan con *H. parasuis*, el siguiente paso pasa por su identificación. Antiguamente, se trataba de un proceso lento y hasta tedioso para poder diferenciarlo de

otras bacterias de características similares, presentes también en el cerdo, como ocurre con varias especies del género *Actinobacillus* (*A. indolicus*, *A. minor*, *A. pleuropneumoniae* o *A. porcinus*), dentro de las cuales algunas incluso pueden cursar con una sintomatología bastante similar (Nedbalcova *et al.*, 2006). Entre las pruebas necesarias para su diferenciación fenotípica se encuentra la prueba CAMP (acrónimo de Christie, Atkins, Munch y Peterson), la determinación de la ausencia de hemólisis y pruebas bioquímicas del tipo de la ureasa, indol y catalasa. *H. parasuis* debe ofrecer un resultado negativo a todas estas pruebas, con la excepción de la catalasa (Oliveira, 2007).

En las últimas décadas, el desarrollo de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha facilitado y acelerado ostensiblemente el proceso de identificación de *H. parasuis*, evitando la realización de pruebas bioquímicas. Oliveira *et al.* (2001) diseñaron una PCR para amplificar el gen que codifica el ARN ribosómico 16S, que resultó específica de la especie salvo en el caso de *Actinobacillus indolicus*, que forma parte de la *microbiota* de la porción superior de las vías respiratorias y no produce poliserositis ni poliartritis; por lo tanto, si la toma de muestras es adecuada no debería conducir a errores. Solo en el caso de hacer estudios epidemiológicos en cerdos sanos, en los que no queda otra alternativa que recurrir al muestro de cavidad nasal, *A. indolicus* podría interferir.

Unos años más tarde, el mismo grupo de investigación presentó una nueva PCR basada de nuevo en el gen del ARN 16S, en la que, mediante la combinación de tres cebadores, se conseguía evitar los falsos positivos producidos por bacterias del género *Actinobacillus* (Angen *et al.*, 2007). No obstante, esta nueva PCR, aunque más específica, resultaba menos sensible que la anterior.

Posteriormente, Turni *et al.* (2010) desarrollaron una PCR en tiempo real (RT-PCR) en la que se amplificaba el gen *infB*, tras descartar el gen 16S porque producía falsos positivos con *Pasteurella mairii*. Esta RT-PCR permitía aumentar considerablemente la sensibilidad con respecto a las PCRs convencionales y resultaba completamente específica. A esto había que añadir que esta nueva técnica, además de aplicarse a cultivos aislados a partir de animales enfermos, también podía emplearse directamente sobre muestras de órganos o fluidos, lo que permitía acortar el tiempo de diagnóstico. Sin embargo, con el tiempo se observó que algunas cepas no eran capaces de ser detectadas con esta RT-PCR mientras que sí lo eran con la primera PCR convencional (Turni & Blackall, 2011).

Como ya hemos mencionado, una PCR multiplex desarrollada hace dos años se basa en 15 parejas de cebadores cuya combinación permite distinguir la mayoría de serotipos. Una de ellas, la que amplifica el gen HPS_219690793, es específica de *H. parasuis* sin generar falsos positivos con especies relacionadas (Howell *et al.*, 2015).

1.1.6.4. Diagnóstico serológico

Respecto al diagnóstico serológico, se han desarrollado diferentes métodos para la detección de anticuerpos específicos frente a la bacteria, como la fijación del complemento (Takahashi *et al.*, 2001), la hemaglutinación indirecta (Miniats *et al.*, 1991) o diferentes modalidades de la técnica ELISA (Miniats *et al.*, 1991; Solano-Aguilar *et al.*, 1999).

Sin embargo, el diagnóstico serológico no suele resultar de mucha utilidad, debido a que, como se ha dicho antes, la bacteria se encuentra como comensal de las vías respiratorias, por lo que los cerdos de una explotación donde previamente circule la bacteria siempre resultarán positivos. Además, las vacunas utilizadas hoy en día para el control de la enfermedad, comerciales o autovacunas frente a la cepa presente en la explotación, se basan en bacterias inactivadas por lo que la serología tampoco permite diferenciar animales vacunados de enfermos o portadores (Liu *et al.*, 2016). Por otro lado, en caso de que el brote se debiera a una cepa virulenta que hubiera aparecido en una granja libre, en la que además no se practicara la vacunación, la serología tampoco resultaría la mejor opción porque, hasta transcurrida una semana del inicio de la sintomatología no se detectarían anticuerpos (Nedbalcova *et al.*, 2006).

1.1.6.5. Perfil proteico mediante espectrometría de masas

En los últimos años, la espectrometría de masas mediante MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) se está convirtiendo en una importante herramienta para el diagnóstico de enfermedades infecciosas mediante la identificación de microorganismos patógenos a través de su perfil proteico (Moreno *et al.*, 2016).

Biotyper 3.0 es una base de datos que contiene perfiles proteicos de diversas especies bacterianas obtenidos mediante MALDI-TOF. El perfil proteico obtenido a partir de un microorganismo aislado, se puede enfrentar a la base de datos que, en base a un sistema de puntuación, lo encuadrará dentro de una especie concreta. En 2012 se amplió dicha base de datos con más de 40 especies pertenecientes a 15 géneros de la familia *Pasteurellaceae*, incluyendo varias cepas de *H. parasuis* (Kuhnert *et al.*, 2012).

Un estudio posterior (Moreno *et al.*, 2016) demostró la fiabilidad de este método para la identificación de 98 aislados de *H. parasuis*.

1.1.7. Tratamiento

El tratamiento de elección es la antibioterapia administrada por vía parenteral, además, para que sea lo más eficaz posible, debe de ser aplicada tan pronto se observen los primeros síntomas. Para que el agente antimicrobiano puede alcanzar el fluido cerebroespinal así como el sinovial es necesario administrarlo en altas dosis (Nedbalcova *et al.*, 2006).

De los diferentes estudios llevados a cabo sobre el fenómeno de aparición de resistencia a antimicrobianos en *H. parasuis* se desprende que existe una importante variabilidad geográfica con respecto a la presencia de cepas resistentes a los diferentes antibióticos muestrados. En España, un estudio llevado a cabo por Martín de la Fuente *et al.* (2007) observó que un importante porcentaje de cepas aisladas en campo presentaban resistencia a más de un antibiótico, siendo el florfenicol el único para el que todas se mostraban sensibles (Tabla 3). Las cepas españolas estudiadas fueron comparadas con otras suministradas por la Universidad de Cambridge y se comprobó que las británicas se mostraban mucho más susceptibles, hasta el punto de que todas o su gran mayoría resultaban inhibidas *in vitro* por la acción de la penicilina, ampicilina, ceftiofur, eritromicina, tilmicosina, enrofloxacino, tiamulina o florfenicol, lo que demostró que las explotaciones porcinas del Reino Unido se veían sometidas a una presión antibiótica mucho menor que las granjas españolas.

Antibiótico	% de resistencia (n=30)
Ampicilina	56,7
Ceftiofur	6,7
Enrofloxacino	20
Eritromicina	40
Espectinomicina	23,3
Florfenicol	0
Gentamicina	26,7
Neomicina	33,3
Oxitetraciclina	40,0
Penicilina	60,0
Tiamulina	40,0
Tilmicosina	40,0
Trimetoprima-Sulfametoxazol	53,3

Tabla 3: Resistencias a antibióticos en *H. parasuis*. Porcentaje de aislados de campo españoles con resistencia a diferentes antibióticos estudiados (Martín de la Fuente *et al.*, 2007).

1.1.8. Prevención

Esta enfermedad constituye un ejemplo del tipo de infecciones potenciadas por el aumento de la industria porcina de carácter intensivo durante las últimas décadas en todo el mundo. En las explotaciones convencionales donde circulan cepas patógenas es importante evitar o disminuir el efecto de factores estresantes para los animales, que pueden ocasionar una bajada de defensas, como la mezcla de animales de edades diferentes, los cambios bruscos de temperatura o la superpoblación, entre otros. También se convierte en esencial el control de las enfermedades víricas concomitantes, como el síndrome respiratorio y reproductor porcino, cuya aparición podría desencadenar una infección simultánea por *H. parasuis*. Una medida que puede resultar útil consiste en la aplicación de vacíos sanitarios (Gottschalk, 2011).

1.1.8.1. Vacunación

Para la prevención de la enfermedad de Glässer, tradicionalmente se han venido utilizando vacunas basadas en bacterias inactivadas (bacterinas) comerciales o, en su

defecto, vacunas autógenas obtenidas por inactivación de la cepa circulante en una determinada explotación ganadera (Oliveira & Pijoan, 2004).

1.1.8.1.1. Vacunas inactivadas

Recientemente, se ha publicado una revisión muy completa, en la que se efectúa un compendio de las diferentes vacunas y candidatos vacunales probados hasta el año pasado (Liu *et al.*, 2016), de la que resumiremos algunos de los aspectos más destacados.

A día de hoy, todas las vacunas comerciales disponibles se basan en bacterinas producidas a partir de una cepa virulenta inactivada. Estas bacterinas suelen inducir una buena protección frente a cepas del serotipo homólogo, lo que permite mantener protegidos a los lechones durante la lactación, si estos proceden de madres vacunadas, y durante el crecimiento, si previamente al destete se les aplica una primera dosis y posteriormente una serie de ellas de recuerdo.

No obstante, el uso de bacterinas presenta una serie de inconvenientes, principalmente la escasa protección cruzada observada frente a las cepas de otros serotipos (de la Fuente *et al.*, 2009). De las pruebas realizadas hasta el momento en el cerdo, solo se ha observado una protección heteróloga completa en el caso de una bacterina producida a partir del serotipo 3, pero restringida solamente frente a cepas de los serotipos 1 y 4 (Brockmeier *et al.*, 2013). El resto de estudios sobre protección cruzada solo han mostrado un bajo nivel de protección heteróloga, nunca completa y solo frente a algunos serotipos concretos.

Un modo de paliar en parte esta falta de protección cruzada podría basarse en la combinación de varios serotipos en una sola bacterina, como la formulada a finales de la década pasada por nuestro grupo, combinando cepas de los serotipos 2, 4 y 5, los más prevalentes en España (Martin de la Fuente *et al.*, 2009). Sin embargo la combinación de cepas en una sola bacterina es un proceso complicado y los resultados hasta ahora tampoco han mejorado mucho en la obtención de una protección cruzada completamente eficaz. Como ejemplo de lo anterior, se puede citar lo observado para una bacterina diseñada a partir de una combinación de los serotipos 4 y 5 que, además de proteger completamente frente a éstos, también protegió frente a los serotipos 13 y 14, aunque de forma parcial (Liu *et al.*, 2016). Otro caso sería el de una bacterina comercial preparada con los serotipos 1 y 6, que protegió parcialmente frente a los serotipos 4 y 5 (Zhao *et al.*, 2017).

Otros problemas asociados a las bacterinas consisten en la imposibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados o en la pérdida de antígenos de la superficie bacteriana, como consecuencia del tratamiento físico y/o químico llevado a cabo durante la inactivación. Para solucionar este último inconveniente se han abordado varias vías, entre otras, los trabajos dirigidos a estudiar la protección otorgada por la inoculación de bacterias vivas pertenecientes a serotipos carentes de virulencia. Este abordaje ha sido ya explorado desde hace tiempo, habiéndose demostrado que la administración mediante aerosol de cepas de serotipos poco o nada virulentos, como el 2, 3, 4 o 7, permite la supervivencia de cerdos desafiados posteriormente con una cepa del serotipo 5, de gran virulencia por tanto (Nielsen, 1993).

Otra posibilidad para evitar la pérdida de antígenos a causa de la inactivación, bastante prometedora, pasa por la utilización de los denominados “fantasmas o espectros bacterianos”, que son bacterias carentes de contenido y por lo tanto no infecciosas. Esto se consigue introduciendo en la bacteria el gen de lisis *E*, procedente del bacteriófago PhiX174, que desencadena la formación de túneles en las membranas de las bacterias Gram negativas, por donde se libera el contenido citosólico, obteniéndose de este modo únicamente la envoltura (Langemann *et al.*, 2010). Se puede considerar que se trata de un método de inactivación bacteriana que permite evitar tratamientos físico-químicos con la subsecuente pérdida de antígenos que aquéllos conllevarían.

Con respecto a *H. parasuis*, se consiguió obtener uno de estos fantasmas bacterianos a partir de la cepa Nagasaki mediante su transconjugación con una de cepa de *E. coli* portadora de un plásmido con el gen de lisis *E*. El fantasma bacteriano resultante, al ser utilizado como vacuna y valorado frente al desafío con la cepa Nagasaki, indujo una protección aún mayor que la conferida por una bacterina tradicional preparada a partir de la misma cepa (Hu *et al.*, 2013), debido seguramente a la pérdida de antígenos de la vacuna durante su proceso de inactivación.

No obstante, tanto los fantasmas bacterianos como la utilización de cepas avirulentas vivas presentan el mismo problema, en lo que a falta de protección cruzada se refiere.

1.1.8.1.2. Vacunas de subunidades

Una alternativa al uso de bacterias inactivadas se encuentra representada por las vacunas de subunidades, teniendo como ventajas el riesgo nulo de contagio de la

enfermedad, en comparación con las vacunas atenuadas; así como la de utilizar exclusivamente antígenos protectores, a diferencia de las bacterinas, elaboradas a partir de células bacterianas completas, además de obviar el riesgo de los procesos de inactivación fallidos o incompletos.

En las últimas dos décadas de investigación en el campo de la inmunoprofilaxis, la vacunología inversa ha supuesto una revolución sin precedentes. Las herramientas bioinformáticas, cada día más perfeccionadas, permiten el estudio del genoma, transcriptoma o proteoma de los patógenos en la búsqueda de proteínas que puedan suponer nuevos antígenos potenciales (Sette & Rappuoli, 2010).

En el caso de *H. parasuis*, se han probado diversas vacunas de subunidades, aunque todavía no se dispone de ninguna autorizada ni comercializada. Principalmente se ha trabajado con proteínas de la membrana externa (*outer membrane proteins*, OMP). Muchos de los estudios llevados a cabo sobre esta línea de investigación se han realizado solo en un modelo animal diferente del cerdo, habitualmente el ratón, el conejo o el cobayo, por lo que resulta imprescindible probar estas mismas formulaciones en el cerdo, hospedador natural de la bacteria, a fin de confirmar lo observado en estos modelos experimentales, que, como es sabido, no resultan del todo convenientes.

De las escasas OMPs probadas en cerdo, solo la proteína B de unión a la transferrina (*transferrin-binding protein B*), producida mediante la tecnología del ADN recombinante incorporando una mutación puntual que le impedía casi prácticamente la unión completa a la transferrina porcina, ha conseguido una protección total en cerdos durante una prueba de desafío experimental llevada a cabo en nuestras instalaciones con la cepa homóloga (cepa Nagasaki del serotipo 5, en este caso) (Frاندoloso *et al.*, 2015a). Esta mutación mejoró la protección otorgada en comparación con la proteína nativa, la cual había sido probada previamente por nuestro grupo en dos ocasiones, habiéndose conseguido en el mejor de los casos una protección parcial (Frاندoloso *et al.*, 2011b; Martin de la Fuente *et al.*, 2009).

Otras vacunas de subunidades que han mostrado asimismo una protección completa frente a un desafío con la cepa homóloga en cerdos son una vacuna basada en OMPs con afinidad por la transferrina porcina (Frاندoloso *et al.*, 2011b) y otra basada en vesículas de membrana externa (*outer membrane vesicles*, OMV) (McCaig *et al.*, 2016). La primera fue elaborada por nuestro grupo mediante la separación por cromatografía de

afinidad de aquellas proteínas con afinidad por la transferrina porcina presentes en un extracto de OMPs (Frاندoloso *et al.*, 2011b). Con respecto a la segunda vacuna con protección total, se basó en OMVs, que son vesículas bacterianas liberadas al medio, que pueden contener toxinas, moléculas de señalización, servir para la comunicación bacteriana o para la liberación de otros factores de virulencia u otros componentes en el interior de células del hospedador mediante la fusión de membranas. A partir de la cepa Nagasaki se generaron OMVs que, al ser utilizadas como inmunógenos vacunales en cerdos, permitieron una supervivencia al desafío experimental con la misma cepa (McCaig *et al.*, 2016). Para estas tres vacunas de subunidades (TbpB mutante, OMPs con afinidad por transferrina porcina y OMVs) que han mostrado una protección total frente a la cepa homóloga, todavía no se ha valorado su capacidad de protección heteróloga.

En la Tabla 4 se muestran algunas de las OMPs investigadas hasta la fecha en *H. parasuis*, el modelo animal utilizado y la protección conferida.

PROTEÍNAS	MODELO ANIMAL	PROTECCIÓN	REFERENCIA
OMPs*	cerdo	incompleta	(Martin de la Fuente <i>et al.</i> , 2009)
OMPs**	cerdo	completa	(Frاندoloso <i>et al.</i> , 2011b)
TbpB nativa	cerdo	incompleta	(Frاندoloso <i>et al.</i> , 2011b)
TbpB mutante	cerdo	completa	(Frاندoloso <i>et al.</i> , 2015a)
TbpA	cobaya	incompleta	(Huang <i>et al.</i> , 2013)
TbpA	cerdo	incompleta	(Frاندoloso <i>et al.</i> , 2011b)
OMP P2	ratón	incompleta	(Zhou <i>et al.</i> , 2009a)
OMP P5	ratón	incompleta	(Ahn <i>et al.</i> , 2012)
VtaA	cerdo	incompleta	(Olvera <i>et al.</i> , 2011)
GADPH	cerdo	incompleta	(Fu <i>et al.</i> , 2013)
OapA	cerdo	incompleta	(Fu <i>et al.</i> , 2013)
HPS_0675	cerdo	incompleta	(Fu <i>et al.</i> , 2013)
6-PGD	conejo	incompleta	(Fu <i>et al.</i> , 2012)
Cdt A, B y C	ratón	incompleta	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
Neuraminidasa	ratón	incompleta	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
SmpA	ratón	incompleta	(Yuan <i>et al.</i> , 2012)
OMP YgiW	ratón	incompleta	(Yuan <i>et al.</i> , 2012)
OMP FOG	ratón	incompleta	(Yuan <i>et al.</i> , 2012)
Plp4	ratón	incompleta	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
PlpD	ratón	incompleta	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
HxuA, B y C	ratón	incompleta	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
HPS_06257	ratón	incompleta	(Zhou <i>et al.</i> , 2009a)
PaIA	ratón	incompleta	(Zhou <i>et al.</i> , 2009a)
OMP D15	ratón	incompleta	(Zhou <i>et al.</i> , 2009a)

Tabla 4: Diferentes OMP de *H. parasuis* que han mostrado protección. Se indica el modelo animal utilizado y el grado de protección obtenida. Actualización y ampliación realizada a partir de una tabla publicada anteriormente (Liu *et al.*, 2016). OMP* indica extracto de OMP de cultivo, obtenido en condiciones restrictivas de hierro, OMP** indica OMP con afinidad por la transferrina porcina.

La búsqueda de vacunas de subunidades que protejan frente al desafío con la cepa homóloga en el cerdo es un primer paso, necesario para posteriores estudios de protección cruzada. En el caso de las diferentes OMPs, si alguna de ellas, de forma independiente o en un conjunto formado por varias, fuera capaz de proteger frente a la cepa homóloga (aunque posteriormente no fuera completamente eficaz frente a otras cepas), se podría combinar en una sola formulación vacunal el mismo o los mismos tipos de proteínas producidas a partir de diferentes cepas, para conseguir la obtención de una vacuna capaz de estimular una protección cruzada completa, lo que supondría un proceso más sencillo que el necesario para la combinación de bacterias completas.

Entre las OMPs caracterizadas inmunológicamente que, a pesar de haber demostrado algún grado de protección en ratón, aún no han sido verificadas en cerdos, se pueden citar las proteínas P2, P5 y D15 (Ahn *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2009a).

La porina P2 es la proteína más abundante de la membrana externa de *H. parasuis*. En estudios llevados a cabo con una cepa a la que se le introdujo una delección en el gen que la codificaba, se pudo demostrar su relación con la captación de algunos elementos importantes para el crecimiento, puesto que la eliminación del gen se tradujo en un descenso acusado de la velocidad de crecimiento *in vitro* (Zhang *et al.*, 2012a). Desde un punto de vista inmunológico, los estudios con la misma cepa mutante han puesto de manifiesto su relación con la capacidad de *H. parasuis* para resistir los efectos de la vía clásica de activación del sistema del complemento (Zhou *et al.*, 2013) y para intervenir en el proceso de adhesión a macrófagos alveolares (Zhang *et al.*, 2012c).

Sin embargo, los estudios realizados con células renales de la línea PK-15 o con las células del cordón umbilical porcino han puesto en evidencia que la eliminación del gen de la proteína P2 en la bacteria produce un incremento de la adhesión e invasión, debido a la sobreexpresión de otros genes relacionados con estos procesos, como los genes *RfaD*, *ThyA* y *Mip*, en un intento de compensar la pérdida de la proteína que sufrió la delección, lo que acaba por provocar un curioso efecto rebote (Zhang *et al.*, 2013). Esta proteína se encuentra distribuida a lo largo de las 15 cepas de referencia de los serotipos de *H. parasuis*, habiéndose encontrado una versión ligeramente más corta en algunas de

ellas (Li *et al.*, 2012), lo que se traduce en la pérdida de un lazo extracelular en su barril β (Mullins *et al.*, 2009), siendo las cepas que presentan esta versión corta más eficaces en la resistencia al complemento (Zhang *et al.*, 2012a).

Varios estudios en los que se ha producido una proteína P2 recombinante de *H. parasuis*, mediante su clonación y expresión en *E. coli* han demostrado que se trata de una proteína inmunógena, capaz de ser reconocida por el suero de los animales expuestos a la bacteria, y que el suero de los ratones inmunizados con ella presenta un incremento de la actividad bactericida. Además, su utilización como antígeno vacunal confiere una resistencia parcial en ratones frente al desafío (Li *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2009a). Por último, en un estudio llevado a cabo mediante inmunoproteómica, se pudo demostrar la presencia de esta proteína en una fracción de OMPs purificadas por su afinidad a la transferrina porcina que, en conjunto, confería cierto grado de protección en cerdos frente al desafío con la bacteria (Martinez-Martinez *et al.*, 2013).

La proteína P5 es una proteína de membrana externa que presenta homología con la OmpA de otras bacterias del género *Pasteurella*, cuya principal función parece ser que radica en el mantenimiento de la integridad de la membrana, aunque también se ha verificado que en otras bacterias puede mantener funciones relacionadas con la patogenicidad, como la adhesión al epitelio nasofaríngeo o la formación de *biofilms* (Zhou *et al.*, 2009b). No obstante, en el caso de los estudios llevados a cabo en *H. parasuis* con una cepa en la que se delecionó el gen que la codificaba, a pesar de apreciarse una disminución en la velocidad de crecimiento con respecto a la cepa salvaje, no pareció verse afectada la capacidad para resistir la acción bactericida del sistema complemento ni las capacidades para adherirse e invadir células del hospedador, al contrario de lo observado para la proteína P2 (Zhang *et al.*, 2012d). Por otro lado, los estudios llevados a cabo en ratón con la proteína obtenida mediante la tecnología del ADN recombinante han demostrado la capacidad de la proteína P5 para la inducción de la formación de anticuerpos neutralizantes (Zhou *et al.*, 2009a) y para la protección parcial de los ratones frente a la bacteria (Ahn *et al.*, 2012).

La proteína D15 es una proteína de la membrana externa de bacterias Gram negativas, necesaria para el ensamblaje correcto de las OMPs en la membrana externa (Zhou *et al.*, 2009b). Al igual que en el caso de la P2, se ha detectado mediante inmunoproteómica en la fracción de proteínas con afinidad por la transferrina porcina (Martinez-Martinez *et al.*, 2013). Los anticuerpos generados en ratones inmunizados con

ella resultaron neutralizantes en pruebas en las que se valoró la actividad bactericida del suero y fue capaz de inducir un cierto grado de protección en este mismo modelo experimental frente a *H. parasuis* (Zhou *et al.*, 2009a). Asimismo, en un estudio mediante PCR a tiempo real, se puso de manifiesto que la cepa Nagasaki presentaba mayores niveles de expresión de esta proteína en comparación con los de una cepa avirulenta, como la SW114 (Wei *et al.*, 2014).

1.2. *Haemophilus parasuis* Y EL COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO

El término “complejo respiratorio porcino” (CRP) se emplea para describir una neumonía en la que pueden participar diferentes microorganismos y que causa sintomatología clínica principalmente entre la semana 16 y 20, aunque también puede afectar a rangos de edades más amplios. La etiología del proceso es múltiple, siendo desencadenada por una serie de diferentes patógenos primarios, tanto virus como bacterias, para luego complicarse por otra serie de agentes secundarios oportunistas entre los que se encuentra *H. parasuis* (Tabla 5). El CRP es causante de importantes pérdidas económicas en el sector porcino ya que puede llegar a causar una reducción de hasta el 6% en la ganancia diaria de peso (Brockmeier *et al.*, 2002b; Gutiérrez Martín, 2014).

Microorganismo	Tipo de agente etiológico
<p>Virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino</p> <p>Virus de la influenza porcina</p> <p>Virus de la enfermedad de Aujeszky</p> <p>Coronavirus</p> <p>Circovirus tipo 2</p> <p><i>Mycoplasma hyopneumoniae</i></p> <p><i>Bordetella bronchiseptica</i></p> <p><i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i></p>	Primarios
<p><i>Pasteurella multocida</i></p> <p><i>Haemophilus parasuis</i></p> <p><i>Streptococcus suis</i></p> <p><i>Actinobacillus suis</i></p> <p><i>Arcanobacterium pyogenes</i></p> <p>Diversos tipos de hongos</p>	Secundarios

Tabla 5: Principales microorganismos relacionados con el Complejo Respiratorio Porcino.

1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

1.3.1. Conceptos

En 1992 (Bone *et al.*) se propuso el término síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) para definir los complejos mecanismos que se originan como consecuencia de la activación sistémica de la respuesta inmunitaria innata, independientemente de su causa. Su origen podía radicar, tanto en una infección, generalizada o localizada, como en un proceso no infeccioso (del tipo de quemaduras, pancreatitis no infecciosas, etc.). Igualmente, definieron la sepsis como un SIRS de origen infeccioso, la “sepsis grave” como una sepsis asociada con una disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión y el choque séptico (o “shock séptico”) como una sepsis con hipotensión arterial, a pesar de una correcta fluidoterapia.

En 2001 (Levy *et al.*) se revisaron estos conceptos y se definió la sepsis como un síndrome clínico caracterizado por la presencia conjunta de infección y respuesta inflamatoria sistémica. La sepsis grave fue definida como una sepsis complicada por una disfunción orgánica, mientras que el choque séptico fue definido como un estado de fallo circulatorio agudo, caracterizado por una persistente hipotensión arterial inexplicable por otras causas diferentes de la sepsis. Además, vinieron a confirmar la hipótesis, previamente establecida, de que el SIRS podía deberse, tanto a un proceso infeccioso como no infeccioso (Levy *et al.*, 2003).

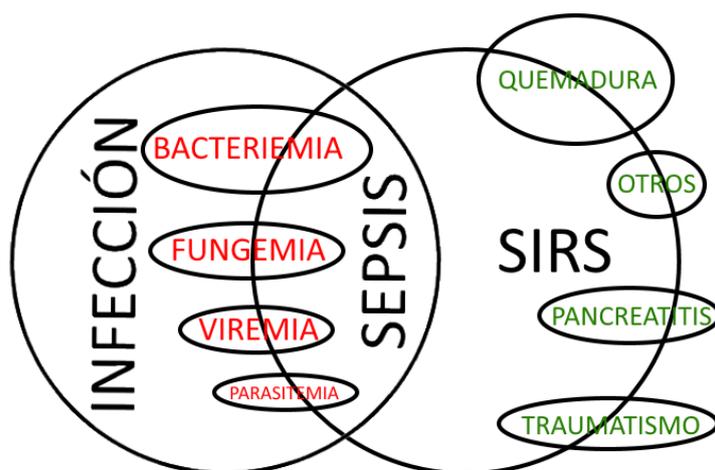


Figura 1: Esquema de los conceptos de sepsis y SIRS. Imagen de elaboración propia, basada en otra publicada anteriormente (Matsuda & Hattori, 2006).

Una década más tarde se volvieron a examinar estos conceptos (Singer *et al.*, 2016) y se definió la sepsis como una disfunción orgánica, peligrosa para la vida, causada por una respuesta desequilibrada del hospedador frente a una infección. El choque séptico fue definido como un tipo de sepsis en el que las anormalidades subyacentes, tanto circulatorias como metabólicas y celulares, son suficientemente profundas como para incrementar sustancialmente la mortalidad. Además, se pasó a considerar superfluo el término sepsis grave, ya que realmente todas las sepsis lo son.

Otro concepto que conviene aclarar es el de la septicemia, debido a que a menudo es utilizado como sinónimo de bacteriemia o incluso de sepsis. La septicemia tradicionalmente se define como la enfermedad sistémica causada por la propagación, vía circulación sanguínea, de un microorganismo y sus toxinas, mientras que se consideraba bacteriemia a la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo, independientemente de la presencia o no de efectos de carácter sistémico (Odeh, 1996). Aunque el término septicemia se encuentra en desuso, consideramos importante aclararlo, puesto que históricamente se describe a *H. parasuis* como una bacteria causante de septicemia en cerdos (Amano *et al.*, 1997).

1.3.2. Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)

Los receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognizing receptors*, PRRs) son proteínas que desempeñan un papel central en el funcionamiento del sistema inmunitario innato. Estos receptores celulares son capaces de detectar señales indicadoras de peligro para el organismo, como sucede por ejemplo con los patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) y los patrones moleculares asociados a daño (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs).

Dentro de los PAMPs podemos encontrar lipopolisacáridos (LPS) y por extensión los lipooligosacáridos (LOS), peptidoglucano, ácido lipoteicoico, flagelina, ADN y otros componentes de los microorganismos. Como ejemplo de los DAMPs podríamos citar, entre otras, las proteínas de choque térmico eucariotas, el fibrinógeno o el ácido hialurónico (Wiersinga *et al.*, 2014).

Los PRRs resultan imprescindibles para mantener al organismo protegido frente a las infecciones y otro tipo de daños; sin embargo, su sobreestimulación puede desencadenar la aparición de sepsis, con consecuencias nefastas para el hospedador.

Dentro de los PRRs, podemos encontrar diferentes tipos, como los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs), los receptores tipo NOD (*Nod-like receptors*, NLRs), los receptores lecitina tipo-C (*C-type lectin receptors*, CLRs) y los receptores tipo RIG-I (*RIG-I-like receptors*, RLRs).

1.3.2.1. Receptores tipo Toll (TLRs)

Los TLRs son considerados los PRRs más importantes. Son proteínas localizadas en diferentes tipos de células, principalmente del sistema inmunitario, capaces de reconocer PAMPs o DAMPs e iniciar una ruta de señalización celular que desencadene una respuesta inflamatoria. Estos tipos de receptores poseen un ectodominio rico en repeticiones de leucina (*leucin rich repetitions*, LRR), capaz de reconocer los ligandos correspondientes. También poseen un dominio citoplasmático conocido como TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*), necesario para la interacción con los demás componentes de la ruta de señalización celular (el nombre del dominio se debe a que es compartido entre los TLR y el receptor de la interleuquina 1). Dicha ruta, con excepción del TLR-3, es dependiente del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88, por sus siglas en inglés) (Kawai & Akira, 2010).

Cuando un ligando es reconocido por el ectodominio de un TLR, el dominio citosólico TIR interacciona con el dominio TIR de la MyD88. Esta interacción puede ser directa, como en el caso de TLR-5, o indirecta, como en TLR-2 o TLR-4, en lo que es necesario un adaptador intermedio conocido por los nombres de “adaptador que contiene el dominio TIR” (TIRAP por sus siglas en inglés) o de “adaptador tipo MyD88” (MAL, por su acrónimo en inglés). MyD88, a su vez, interacciona con la “quinasa asociada a receptor de IL1” (IRAK, por sus siglas en inglés) y da inicio a una cascada de activación que culmina, por una lado, con la fosforilación de la proteína I κ B y, por otro, con la fosforilación de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, acrónimo en inglés) (Kawai & Akira, 2010).

La proteína I κ B inhibe en condiciones normales la entrada en el núcleo del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas (NF κ B). Sin embargo, la fosforilación de la I κ B desencadena la liberación del NF κ B, que entonces puede penetrar en el núcleo y promover la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunitaria, como los de las citoquinas. Las MAPKs, como la p38, la c-jun amino-terminal quinasa (JNK, siglas en inglés) o las proteínas quinasas reguladas por señal

extracelular (ERKs, acrónimo en inglés), al ser fosforiladas, producen la activación de varios factores de transcripción que también desencadenan la expresión de genes de citoquinas (Kawai & Akira, 2010).

En el caso del TLR-7 y del TLR-9, la señal de MyD88, además de la ruta vía NFκB, puede inducir la expresión de interferones a través del factor regulador de interferones 7 (IRF7, acrónimo en inglés) (Uematsu *et al.*, 2005). Existe otra ruta de señalización independiente de MyD88 que actúa a través del “adaptador que contiene el dominio TIR inductor de interferón β” (TRIF, por sus siglas en inglés). Esta ruta es la única que utiliza el TLR-3, aunque también es utilizada por el TLR-4 junto a la ruta dependiente de MyD88. Cuando el TLR-3, que está localizado en los endosomas, es estimulado por sus ligandos, se produce su interacción con el TRIF, para dar comienzo a una cascada de activación mediante dos rutas diferentes. Por un lado, induce la expresión de interferones a través del factor regulador de interferón 3 (IRF3) y, por otro, estimula la expresión de genes a través de NFκB y MAPKs, de una forma similar a como ocurre en la ruta dependiente de MyD88. En el caso del TLR-4, la dinámica consiste en que, primeramente, cuando es estimulado por su ligando, transmite la señal de transducción a través de MyD88 activando NFκB y MPAKs, lo que desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias y, a continuación, sufre endocitosis y transmite la señal a través de la ruta de TRIF, activando NfκB e IFN de tipo I, de igual forma a como ocurre en el TLR-3 (Kawai & Akira, 2010).

La mayoría de los TLRs se encuentran formando homodímeros. Sin embargo, el TLR-2 es una excepción puesto que forma heterodímeros con el TLR-1 o el TLR-6 (Uddin *et al.*, 2012). En la Figura 2 se representa un esquema de las diferentes rutas de señalización, con su gran complejidad.

En el conjunto de los mamíferos se han descrito hasta 13 TLRs, los cuales varían en cuanto al tipo de molécula que reconocen, en su ruta de señalización, así como en su localización en la célula (Tabla 6). La diversidad de moléculas reconocidas por el conjunto de TLRs permite la detección de la práctica totalidad de patógenos, tanto virus (TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8 y TLR-9), como bacterias (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9, TLR-11 y TLR-13), hongos (TLR-2, TLR-4, TLR-6 y TLR-9) y protozoos (TLR-2, TLR-9 y TLR-12). Además, aunque la mayoría de los ligandos descritos con los que interactúan los TLRs son PAMPs, también se han encontrado TLRs que lo hacen con DAMPs (TLR-2 y TLR-4) (Savva & Roger, 2013).

Los TLRs localizados en la superficie celular detectan patógenos o, más bien, PAMPs de patógenos, en las inmediaciones de las células, mientras que los TLRs de localización intracelular reconocen PAMPs de patógenos intracelulares o PAMPs de patógenos previamente fagocitados y degradados (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Dentro de los implicados en el reconocimiento de bacterias, los más importantes y estudiados, son el TLR-2 y el TLR-4 (Arce *et al.*, 2010).

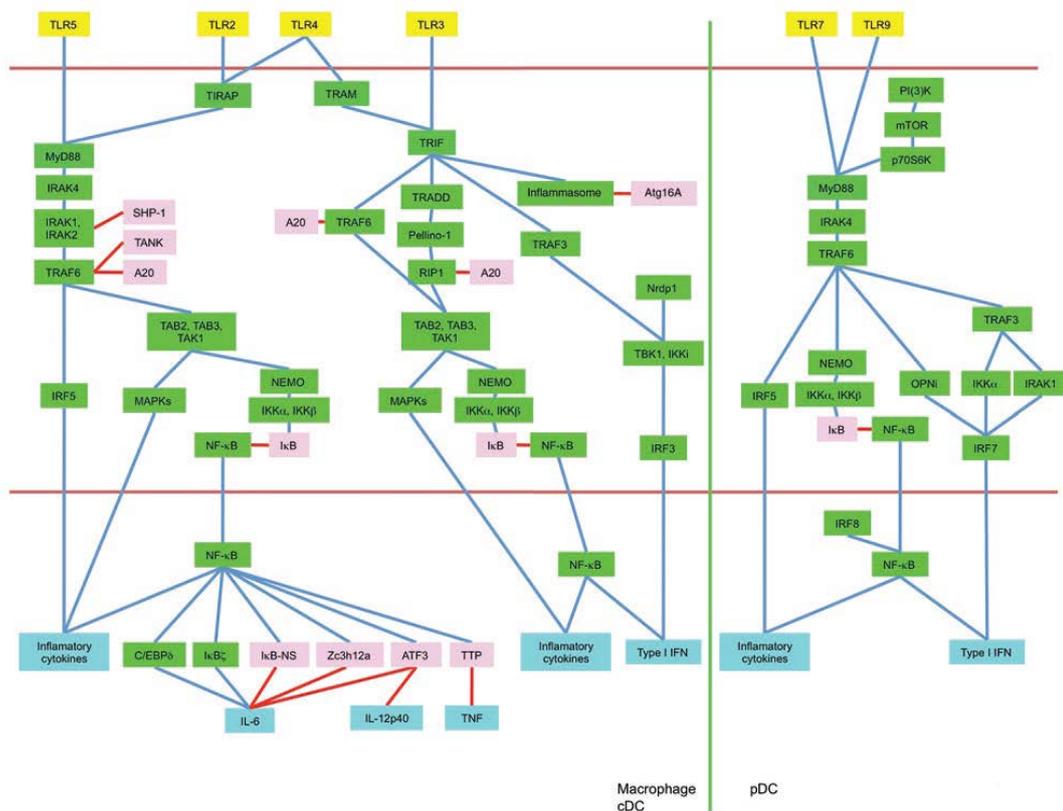


Figura 2: Esquema de las rutas de señalización de los TLRs. Por encima de la línea roja superior se representa el espacio extracelular (a la izquierda de la línea verde) o endosomal (a la derecha de la línea verde). Por debajo de la línea roja inferior se representa el núcleo y, entre ambas líneas rojas, el citosol (Kawai & Akira, 2010).

Receptor	Sub-cellular expression	Adaptor molecule	Ligand	Origin
TLR1 (with TLR2)	Cell membrane	MyD88/TIRAP	Triacyl lipopeptides Soluble factors	Bacteria, mycobacteria <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2 (with TLR1 or TLR6)	Cell membrane	MyD88/TIRAP	Lipoproteins, lipopeptides Lipoteichoic acid Peptidoglycan Lipoarabinomannan Phenol-soluble modulín, porins Atypical LPS Glycoinositolphospholipids, glycolipids Beta-glucan, mannan Core and NS3 proteins, dUTPase, glycoproteins HSP70	Various pathogens Gram-positive bacteria Bacteria Mycobacteria <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Trypanozoma</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Plasmodium</i> Fungi Hepatitis virus, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus Host
TLR3	Endolysosomal	TRIF	Double-stranded RNA	Viruses
TLR4	Cell membrane and endolysosomal	MyD88/TIRAP, TRIF/TRAM	LPS O-linked mannan Taxol Fusion and envelope protein HSP60 HMGB1, HSP70, fibronectin, fibrinogen	Gram-negative bacteria Fungi Plants Respiratory syncytial virus, mouse mammary tumor virus <i>Chlamydia pneumoniae</i> Host
TLR5	Cell membrane	MyD88	Flagellin	Flagellated bacteria
TLR6 (with TLR2)	Cell membrane	MyD88/TIRAP	Diacyl lipopeptides, lipoteichoic acid, β -glucan	<i>Mycoplasma</i> , Gram-positive bacteria, fungi
TLR7	Endolysosomal	MyD88	Single-stranded RNA Imidazoquinoline, loxoribine, bropirimine	Viruses, bacteria Synthetic compounds
TLR8	Endolysosomal	MyD88	Single-stranded RNA Imidazoquinoline	Viruses, bacteria Synthetic compounds
TLR9	Endolysosomal	MyD88	CpG-containing DNA Homozoin	Bacteria, viruses, fungi <i>Plasmodium falciparum</i>
TLR10 (\pm TLR1 or TLR2)	Cell membrane	MyD88	Lipopeptides (prediction)	
TLR11	Endolysosomal	MyD88	Flagellin	Flagellated bacteria
TLR12	Endolysosomal	MyD88	Profilin	Apicomplexan parasites
TLR13	Endolysosomal	MyD88	23S RNA	Bacteria

Tabla 6: Localización en la célula, ruta de señalización y ligandos reconocidos por los diferentes TLRs. Se muestran aquellos descritos en **seres humanos** (TLR-1 a TLR-10) y **ratones** (TLR-11, TLR-12 y TLR-13) (Savva and Roger, 2013).

Con respecto al cerdo, se han encontrado en su genoma los genes que codifican los TLRs 1 al 10 (Uenishi & Shinkai, 2009). Su expresión se ha descrito en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y en células epiteliales (Uddin *et al.*, 2012). En el caso del TLR-2 y del TLR-4, los más importantes en el reconocimiento bacteriano, se ha descrito la expresión del TLR-2 en diferentes células del sistema inmunitario, como los macrófagos, monocitos y neutrófilos, pero no en los linfocitos. Además, también se han observado en células epiteliales presentes en el aparato digestivo, en la porción tráqueo-bronquial, en los túbulos renales, en los conductos biliares y en la capa basal de la epidermis (Álvarez *et al.*, 2008). En el caso del TLR-4, se ha descrito su expresión en los monocitos, células dendríticas y macrófagos, así como en diferentes órganos linfoides, como la médula ósea, los ganglios, bazo y timo, y no linfoides, como el cerebro, hígado, riñón y ovario (Álvarez *et al.*, 2006).

1.3.2.2. Receptores tipo NOD (NLRs)

Los receptores tipo NOD (NLRs) son PRRs intracelulares que reconocen PAMPs o DAMPs en el citosol, al contrario de los TLRs, que interactúan con ligandos en el exterior celular o en el interior de los endosomas. Su denominación es debida a que todos presentan un dominio central, conocido como dominio de oligomerización de unión a nucleótido (NOD por su acrónimo en inglés). En el extremo C-terminal presentan un dominio LRR y en el N-terminal pueden exhibir un dominio conocido como dominio N-terminal de reclutamiento de caspasas (CARD, por sus siglas en inglés) u otro dominio conocido como dominio pirina (PYD, por sus siglas en inglés). El dominio C-terminal (LRR) sería el que interactuaría con el ligando, mientras que el N-terminal (CARD o PYD) sería el responsable de transmitir la señal de transducción.

Filogenéticamente, dentro de los NLRs se pueden establecer tres grandes familias: los NODs, que dan nombre al grupo, los NLRPs y los IPAFs (Schroder & Tschopp, 2010). Dentro de los NODs, en su papel como detectores de PAMPs bacterianos destacan el NOD1, que reconoce al ácido γ -D-glutamil-meso-diaminopimélico, un componente del peptidoglucano, y el NOD2, que reconoce el muramil dipéptido (Osvaldova *et al.*, 2017). En cualquier caso, al reconocer sus respectivos ligandos se forman oligómeros entre los receptores, lo que origina una señal que culmina en la activación del NF κ B, lo que provoca a su vez la expresión de genes proinflamatorios

(Kufner *et al.*, 2006). Se especula con que los NOD desempeñan un papel importante en la regulación del sistema inmunitario efectuada por la *microbiota* intestinal. Ambos receptores tipo NOD están presentes en el cerdo.

1.3.2.3. Otros receptores de reconocimiento de patrones

Dentro de los PRRs existen asimismo otros receptores, como los receptores de lectinas tipo C (CLRs, por su acrónimo en inglés), que son lectinas localizadas en la membrana citoplasmática, lugar donde reconocen carbohidratos procedentes de virus, bacterias y hongos, lo que desencadena la producción de citoquinas inflamatorias o la inhibición de señales procedentes de los TLRs. También se añaden a esta relación los receptores tipo RIG-I (RLR), que se localizan en el citosol y están implicados en el reconocimiento del ARN vírico (Takeuchi & Akira, 2010). El término RIG-I proviene de las siglas en inglés para el gen I inducible por ácido retinoico.

1.3.3. La tormenta de citoquinas

Al detectarse un estímulo dañino, por lo general de origen infeccioso, se produce una compleja respuesta mediada por citoquinas, cuyo fin último es mantener controlado el daño y eliminarlo. Las citoquinas producidas inicialmente atraen células del sistema inmunitario y les inducen, a su vez, a producir más citoquinas. Este proceso debe de estar estrechamente regulado ya que, de lo contrario, la respuesta inmunitaria podría volverse más dañina que el propio agente desencadenante, lo que sucede en ocasiones con resultados incluso letales (shock séptico).

Puede suceder que las células que lleguen atraídas por las citoquinas comiencen a producir más citoquinas, que a su vez atraerían más células inmunitarias que producirían más citoquinas, lo que desencadenaría un bucle de retroalimentación positiva con consecuencias negativas para el organismo, como la aparición del SIRS. Cuando ocurre esta retroalimentación se habla de “tormenta de citoquinas” (Matsuda & Hattori, 2006). Para mantener fisiológicamente equilibrada la respuesta inmunitaria y evitar el desencadenamiento de la sepsis u otros efectos perniciosos de una respuesta inmunitaria exacerbada, se han desarrollado diferentes mecanismos, como las lectinas tipo inmunoglobulinas de unión al ácido siálico (Siglec por sus siglas en inglés) que, al ser estimulados por el ácido siálico del hospedador, ejercen de freno sobre las señales activadoras del sistema inmunitario (Crocker *et al.*, 2012).

1.3.4. Lectinas tipo inmunoglobulinas de unión a ácido siálico (Siglec)

1.3.4.1 Ácidos siálicos

Los ácidos siálicos constituyen un amplio grupo de moléculas que se localizan en la membrana de las células del organismo, como componentes terminales de glucolípidos y glucoproteínas (Schauer, 2009). Todos ellos derivan del ácido neuramínico, una molécula de 9 carbonos con un grupo carboxilo en la posición 1 y un grupo amino en la posición 5, que generalmente se encuentra acetilado, formando el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). A su vez, el Neu5Ac sufre una sustitución de un hidrógeno del metil medio del grupo acetilo por un grupo hidroxilo, formándose el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), presente en la mayoría de los mamíferos, incluido el cerdo, aunque curiosamente no lo está en el ser humano, debido a la pérdida de una enzima (Traving & Schauer, 1998).

El Neu5Ac se sintetiza en el citosol, para ser transportado al interior del aparato de Golgi, donde es transferido a glucoproteínas o glucolípidos (sialización) que posteriormente serán integrados en la membrana (Schauer, 2009). Los ácidos siálicos poseen un gran número de funciones, pero, desde el punto de vista inmunitario, destacaremos las siguientes:

- Ligandos de selectinas, que permiten el tráfico de células del sistema inmunitario y de plaquetas, durante la inflamación (Ley, 2003)
- Inhibición de la vía alternativa del sistema del complemento a través del factor H, lo que permite la discriminación entre las moléculas propias y las ajenas (Meri, 2016)
- Recubrimiento de antígenos propios, lo que evita su posible ataque por parte del sistema inmunitario
- Ligandos de Siglec, que al activarse envían una señal inhibitoria que equilibra la respuesta inmunitaria y permite la discriminación entre las moléculas propias y las ajenas

1.3.4.2. Fisiología de los Siglecs

Las lectinas tipo inmunoglobulinas de unión al ácido siálico (Siglec, por sus siglas en inglés), como ya hemos referido, son receptores para moléculas recubiertas por ácido siálico que, al reconocer su ligando, envían una señal inhibitoria, lo que permite, por una parte, el mantenimiento del equilibrio de la respuesta inmunitaria y, por la otra, la discriminación entre las moléculas propias y las ajenas.

En el ser humano y el ratón, las especies más estudiadas, se han descrito respectivamente un total de 14 y 9 Siglecs diferentes (Macauley *et al.*, 2014). Desde un punto de vista evolutivo, existen dos grandes grupos de Siglecs en mamíferos: los Siglecs 1, 2, 4 y 15, cuyos genes ortólogos se encuentran conservados a través de las diferentes especies estudiadas, y los Siglecs relacionados con el Siglec-3 (o CD33), que presentan un número variable en cada especie, con un elevado grado de similitud de secuencia entre ellos para su dominio extracelular, lo que parece indicar un origen común (Escalona *et al.*, 2015).

Estructuralmente, los Siglecs presentan un número variable de dominios tipo inmunoglobulina, incluyendo un dominio N-terminal, responsable del reconocimiento de ácido siálico, en su porción externa. Con respecto a la estructura intracitoplasmática, pueden diferenciarse 3 tipos de Siglecs (Macauley *et al.*, 2014):

- Los que presentan un motivo inhibitor, conocido como motivo inhibitor de inmunoreceptores basado en tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés), que frena las rutas de transducción de señales mediante el reclutamiento de fosfotiroxinas fosfatasas (PTP, por su acrónimo en inglés)
- Los que presentan un motivo activador, conocido como motivo activador de inmunoreceptores basado en tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés), que estimula las rutas de transducción de señales
- Los que no presentan ninguno de los dos motivos anteriores

Como los Siglecs con motivo ITIM son los que actúan como represores en la respuesta inmunitaria y permiten diferenciar lo propio de lo ajeno, además de ser mayoría, nos centraremos en ellos. El ITIM de los Siglecs, una vez reconocido el ligando correspondiente, sufre una fosforilación por acción de una protein-tiroxina-quinasa (PTK) y, como consecuencia de ello se produce un reclutamiento de PTPs, como son la SHP-1

(*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*), la SHP-2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*) o la inositol-fosfatasa. Este fenómeno de atracción ocasiona una desfosforilación de efectores que actúan en las rutas de señalización celular, como, por ejemplo, la de MyD88 de los TLRs, lo que produce una inhibición de la señal (Barrow & Trowsdale, 2006) (Figura 3).

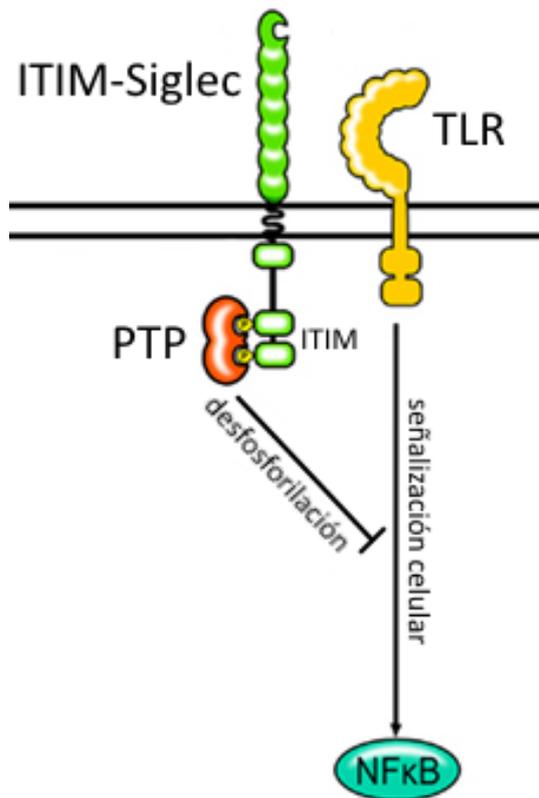


Figura 3: Esquema de la acción inhibitoria de un Siglec tipo ITIM. En este caso ejercida sobre la ruta de señalización de un TLR. Tras la interacción de un Siglec tipo ITIM con su ligando, se desencadena la fosforilación vía proteintiroxin-quinasa (PTK) del motivo ITIM intracitoplasmático, lo que implica la atracción de las enzimas fosfotiroxin-fosfatasa (PTPs) que desfosforilan los efectores de la ruta de señalización iniciada tras el estímulo de un receptor del sistema inmunitario, un TLR en este caso, lo que resulta en su inhibición. Figura modificada a partir de la original publicada por Jellusova & Nitschke (2011)

La interacción de los Siglecs que presentan ITIM con sus ligandos, glucoconjugados recubiertos de ácido siálico, puede ser de dos formas, *cis* o *trans*. En la interacción *cis*, los Siglecs se unen a glucoconjugados presentes sobre la propia célula, debido a que, salvo una única excepción, estos receptores están embebidos dentro del recubrimiento celular de glucoconjugados. Gracias a este tipo de interacción, los Siglecs se encuentran estimulados de forma continua, por lo que su señal puede controlar la señal basal de los receptores activadores de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, de los TLRs.

En el caso de la interacción *trans*, los Siglecs interactúan con los ácidos siálicos que se encuentran recubriendo glucoconjugados localizados sobre otras células o recubriendo glucoproteínas solubles. En ambos casos, la señal inhibitoria generada “informa” a la célula sobre la que se encuentra el Siglec de que la otra célula, o el

compuesto soluble, son propios, y por lo tanto, no resultan peligrosos (Macauley *et al.*, 2014) (Figura 4).

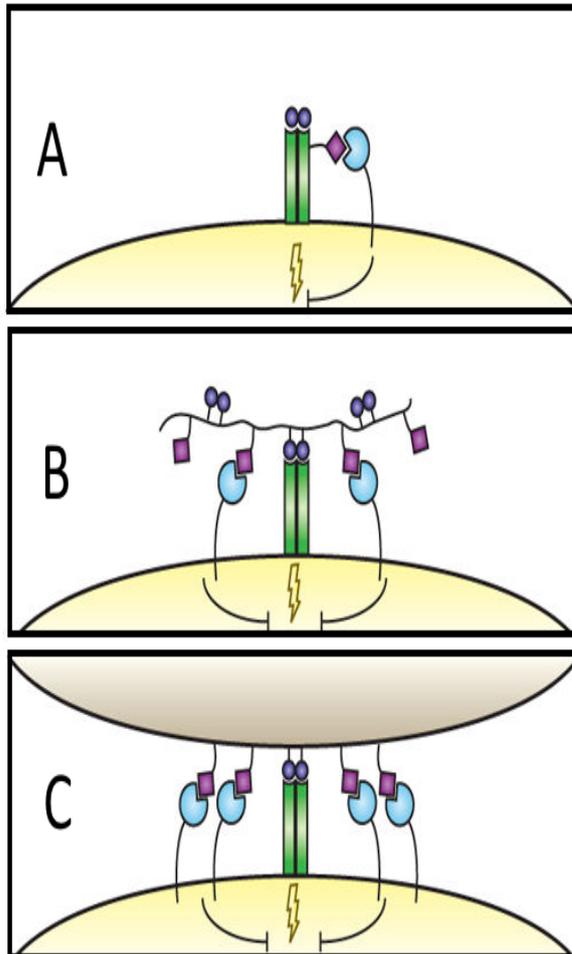


Figura 4: Esquema de los tipos de interacciones entre los Siglec ITIM y sus ligandos, con la ulterior inhibición de la ruta de señalización iniciada por otro receptor. (A) se corresponde a la interacción *cis* con un ligando localizado sobre la propia célula, (B) se corresponde a la interacción *trans* con un ligando soluble y (C) se corresponde a la interacción *trans* con glucoconjugados de otras células. Figura modificada a partir de (Macauley *et al.*, 2014).

1.3.4.3. Explotación por los patógenos de la inhibición inmunitaria mediada por la interacción Siglec - ácido siálico

Se ha demostrado que algunos patógenos, como sucede con varios tipos de virus, bacterias o protozoos, “aprendieron” mediante co-evolución a utilizar la inhibición de la respuesta inmunitaria mediada por los Siglecs como una estrategia de evasión. Estos microorganismos evaden, por tanto, el sistema inmunitario al recubrirse con ácidos siálicos y se mimetizan en el ambiente del individuo hospedador, por lo que pasan desapercibidos y no son reconocidos como “extraños”.

Para la incorporación de ácido siálico (sialización) a su superficie, se han descrito diferentes métodos. Por ejemplo, se puede citar la síntesis *de novo* de derivados

del Neu5Ac, llevada a cabo por algunas bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Neisseria*, *Escherichia* o *Campylobacter*, igual que la adquisición de derivados del Neu5Gc o Neu5Ac desde el medio, realizada por bacterias de los géneros *Haemophilus* y *Pasteurella*. Un caso algo diferente es el de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, que adsorbe en su superficie derivados del Neu5Gc y del Neu5Ac desde el organismo hospedador. Entre los protozoos, *Trypanosoma cruzi* los adquiere del medio mientras que *Leishmania donovani* los adsorbe. También se conocen virus recubiertos por ácido siálico, como el VIH o el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRSS) (Chang & Nizet, 2014).

Como ejemplos concretos del beneficio para el patógeno del mimetismo con los ácidos siálicos, cabe referirse a los estreptococos del grupo B, que son capaces de inhibir la respuesta inmunitaria al recubrir con este ácido sus LPSs, de manera que interactúan con los Siglecs humanos (Carlin *et al.*, 2007), o al caso de *Neisseria meningitidis* y *P. aeruginosa* que, al adquirir el ácido siálico, son capaces de resistir la actividad bactericida del suero (Chang & Nizet, 2014). Un caso curioso de este tipo de mecanismo es el que sucede en el síndrome de Guillain-Barré, una enfermedad autoinmunitaria causada porque los anticuerpos producidos frente a los lipooligosacáridos “sializados” de *Campylobacter jejuni* son capaces de reconocer gangliósidos de los nervios periféricos humanos y desencadenar la consiguiente respuesta contra ellos (Koga *et al.*, 2005).

Además, se han descrito diferentes bacterias y protozoos que presentan sialidasas, un tipo de enzimas hidrolasas capaces de romper la unión entre los ácidos siálicos y sus moléculas portadoras en el hospedador. Este proceso se puede llevar a cabo simplemente con la finalidad de obtención de una fuente de energía (algo observado en diferentes especies de la *microbiota*, que sintetizan sialidasas con actividad hidrolasa (Juge *et al.*, 2016)), o bien para la extracción de ácido siálico del hospedador y su posterior traspaso a la superficie del patógeno (actividad trans-sialidasa) para su camuflaje, efecto este último observado en el protozoo *Trypanosoma cruzi* (Nardy *et al.*, 2016). Debido a que existen bacterias con sialidasas con una estructura similar a la del protozoo (Nordvang *et al.*, 2016), que presentan sialización en su superficie y que no se tiene la certeza de que puedan sintetizar ácidos siálicos, cabe suponer que sialicen su superficie de un modo similar a *T. cruzi*.

En cualquier caso, las sialidasas de los agentes patógenos constituyen una prometedora diana terapéutica, ya que constituyen un factor de virulencia habitual (Hoffmann *et al.*, 2017).

1.3.4.4. Mecanismos de lucha del hospedador frente a patógenos recubiertos de ácido siálico

Se cree que la evolución de ciertos patógenos hacia la utilización de los ácidos siálicos con el objeto de evadir el sistema inmunitario tuvo su contrarreplica evolutiva por parte de los organismos hospedadores, que desarrollaron Siglecs capaces de desencadenar una respuesta frente a dichos patógenos. Esto habría sucedido con los Siglecs que presentan el motivo ITAM en su porción citoplasmática. Esta idea se vería apoyada en el hecho de que aparecen parejas de Siglecs que, resultan idénticos en su porción extracelular, pero difieren intracelularmente al presentar uno un motivo ITIM mientras que el otro exhibe un motivo ITAM. Esto parece indicar que el primigenio Siglec portador de ITIM evolucionó modificando su motivo intracelular por un ITAM, debido a la presión selectiva impuesta por los patógenos sializados (Macauley *et al.*, 2014).

Otro caso de adaptación en la lucha contra los patógenos sializados sería el Siglec-1, también conocido como sialoadhesina o CD169. Este Siglec no presenta motivos ITIM ni ITAM; además, presenta extracelularmente una longitud mayor que el resto de los Siglecs, circunstancia que le permite sobresalir del glucocálix celular y, por lo tanto, evitar la interacción *cis* con la propia célula. Este Siglec actúa como detector de patógenos recubiertos por ácido siálico, lo que promueve su fagocitosis y la estimulación de la respuesta inmunitaria hacia este tipo de patógenos (Chang & Nizet, 2014).

Sin embargo, la carrera evolutiva entre los patógenos y los hospedadores con respecto al ácido siálico no concluye con lo anterior, puesto que el virus del SIDA (Izquierdo-Useros *et al.*, 2012) o el del PRRS (Yuste *et al.*, 2017) son capaces, al recubrirse con este ácido, de aprovechar la fagocitosis mediada por el Siglec-1 para infectar células del hospedador.

1.3.4.5. Siglecs porcinos

En el cerdo se han caracterizado los Siglecs 1, 3, 5 y 10. Se ha observado que el primero de ellos se expresa en subgrupos de macrófagos y células dendríticas (Revilla *et al.*, 2009), mientras que el Siglec-3 (Álvarez *et al.*, 2015) y el Siglec-5 (Escalona *et al.*, 2014) aparecen en la práctica totalidad de los monocitos, macrófagos, granulocitos circulantes y, en menor medida, en los linfocitos B. El Siglec-10 se expresa en los linfocitos B y, en algunos casos, en los monocitos (Escalona *et al.*, 2015).

1.3.4.6. Recubrimiento de *Haemophilus parasuis* por ácido siálico

En 1997, se observó que la membrana de *H. parasuis* presentaba actividad sialidasa y que esta bacteria era capaz de emplear los ácidos siálicos como fuente de nutrientes, una vez que otras fuentes se agotaban (Lichtensteiger & Vimr, 1997). En 2003, se consiguió purificar una sialidasa llamada neuraminidasa a partir de la membrana de la bacteria (Lichtensteiger & Vimr, 2003). Como en otras bacterias del género *Haemophilus*, como es el caso de *H. influenzae* y *H. ducrey*, se encontraron evidencias del recubrimiento de sus LOSs a partir de ácidos siálicos del ambiente extracelular (Goon *et al.*, 2003), por lo que parece lógico que en esta especie ocurra lo mismo.

En 2012, se demostró que la cepa Nagasaki de *H. parasuis* era capaz de transferir a sus LOSs el ácido siálico presente en el medio, al contrario que la cepa no virulenta SW114. Sin embargo, no todas las cepas virulentas del estudio efectuado presentaron actividad sialidasa (hidrolasa), si bien se observó una relación directa entre las cepas avirulentas y la ausencia del gen *lsgB*, que codifica una sialiltransferasa. No obstante, tampoco la totalidad de las cepas virulentas presentaban dicho gen (Martinez-Moliner *et al.*, 2012). El año pasado se describió que la neuraminidasa de *H. parasuis* poseía una actividad transialidasa, similar a la observada en *T. cruzii* (Nordvang *et al.*, 2016).

1.3.3. Receptor CD163

El CD163 es un receptor localizado en la membrana de las subpoblaciones de monocitos y macrófagos. Su función mejor conocida, aunque no la única, consiste en actuar como receptor “basura” o “basurero”, mediante la unión y retirada de sustancias de desecho circulantes. El primer ligando que se observó que era captado por este receptor resultó ser el complejo haptoglobina/hemoglobina (Onofre *et al.*, 2009).

Al producirse hemólisis, la hemoglobina queda libre y puede provocar daño oxidativo, nefrotoxicidad o incluso una estimulación del sistema inmunitario, al ser reconocida como un DAMP (Lee & Ding, 2013). Para evitar su efecto dañino, es secuestrada por la haptoglobina, un tipo de proteína plasmática, y se forma el complejo haptoglobina/hemoglobina, que a su vez es captado posteriormente por el receptor CD163 de los macrófagos, para luego ser degradado en el interior celular. En los seres humanos existen dos alelos diferentes para la haptoglobina, el 1 y el 2; son aquellos complejos formados entre la haptoglobina-1 y la hemoglobina los que presentan mayor afinidad por el CD163 y los que, tras ser internalizados, activan una ruta de señalización a través de la caseína-quinasa II, que culmina con la inducción de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10.

Por otra parte, los complejos haptoglobina/hemoglobina sufren una degradación en el interior celular por la enzima hemooxigenasa, que puede ser de tipo 2 (de expresión constitutiva) o de tipo 1 (inducible). La hemooxigenasa de tipo 1 es inducible por citoquinas anti-inflamatorias como la IL-6, o por la propia estimulación del CD163. Además, este tipo de hemooxigenasa, al degradar la hemoglobina, genera metabolitos anti-inflamatorios con efecto citoprotector, como el monóxido de carbono o la biliverdina. Por lo tanto, esta ruta de eliminación de la hemoglobina libre mediante su secuestro por la haptoglobina, captación por el CD163 y degradación por la hemooxigenasa-1 posee un triple efecto beneficioso, primeramente evita los problemas generados por la hemoglobina libre, además induce la producción de citoquinas anti-inflamatorias por estimulación del receptor CD163 y, por último, genera metabolitos anti-inflamatorios y citoprotectores, al degradar los complejos formados. Todo esto está regulado por la IL-6, que activa la expresión de la haptoglobina, del CD163 y de la hemooxigenasa-1 (Onofre *et al.*, 2009).

Después de la publicación de la descripción de la neutralización de la hemoglobina libre por esta ruta se comprobó que ocurría algo similar con un importante DAMP, el grupo “caja 1” de gran movilidad (*high mobility group box 1*, HMGB1), que también forma un complejo con la haptoglobina, que estimula el CD163 y desencadena la inducción de la IL-10 y de la hemooxigenasa-1. El HMGB1 es una proteína nuclear que cuando sale al exterior celular, bien secretada activamente por células del sistema inmunitario al ser estimuladas, o de forma pasiva por la muerte celular, se comporta como un DAMP que, al interactuar con los PRRs, desencadena la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Yang *et al.*, 2016). Como esta proteína desempeña un papel importante en la inflamación, tanto de origen infeccioso como no infeccioso, es necesario evitar la existencia de unos valores elevados, que podrían desencadenar la aparición de un SIRS.

Otra de las funciones del CD163 consiste en su actuación como sensor para el reconocimiento de bacterias, función en la que participa un dominio diferente al que actúa como receptor basurero para los complejos de haptoglobina. La interacción desencadena la producción por parte del monocito o macrófago de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α . Sin embargo, no parece inducir la fagocitosis de la bacteria (Fabriek *et al.*, 2009).

El CD163 ejerce un papel muy importante durante la sepsis, puesto que presenta tanto un efecto anti-inflamatorio, cuando interactúa con los complejos de la haptoglobina, como un efecto pro-inflamatorio, cuando interactúa con las bacterias. Junto a estas funciones, ha sido relacionado asimismo con la adhesión de los monocitos circulantes al endotelio activado (Onofre *et al.*, 2009).

Además de encontrarse anclado a la membrana de los monocitos y macrófagos, el CD163 puede desprenderse y encontrarse en forma soluble en el plasma y otros fluidos corporales del individuo, como el líquido sinovial o el cefalorraquídeo (Onofre *et al.*, 2009). No se conoce muy bien la función de su forma soluble, aunque se especula con que su desprendimiento puede representar un mecanismo para intentar disminuir la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por la interacción del CD163 de la membrana con las bacterias durante una sepsis (Fabriek *et al.*, 2009). En cualquier caso, se sabe que posee un efecto inmunosupresor sobre los linfocitos T (Frings *et al.*, 2002).

Después de su liberación, sigue reteniendo su capacidad de captación de complejos de haptoglobina (Moller *et al.*, 2010) y de unión a bacterias, lo que favorece en este caso su reconocimiento, fagocitosis y muerte por acción de los granulocitos circulantes (Kneidl *et al.*, 2012). Se emplea la valoración de los niveles de CD163 soluble en el plasma como un indicador pronóstico en pacientes con sepsis (Etzerodt & Moestrup, 2013).

Con respecto al CD163 porcino, su expresión se restringe a las subpoblaciones de monocitos, macrófagos y células dendríticas (Sanchez *et al.*, 1999), pareciendo existir una relación directa entre una mayor maduración celular y una mayor expresión de este marcador en estas células (Chamorro *et al.*, 2000).

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El sector porcino se sitúa en el primer lugar de las producciones ganaderas de España, con una cuota de mercado del 34,2%. Tal importancia se traslada asimismo al ámbito europeo, en el que el país ocupa el segundo lugar entre los Estados de la Unión Europea en producción de carne de porcino, representando su cabaña el 17,3% del total. Con respecto a Castilla y León, esta comunidad autónoma engloba uno de los censos más nutridos del conjunto del Estado, con alrededor del 13% de total español, ocupando la tercera posición entre las comunidades autónomas, solo por detrás de Cataluña y Aragón. Igual que ocurre a nivel estatal, este sector se erige en el más relevante desde un punto de vista económico del conjunto de los sectores ganaderos, representando en el caso castellano-leonés el 17% de la producción agraria total.

La intensificación de los sistemas productivos en la industria porcina durante las últimas décadas ha propiciado el aumento de la prevalencia de diferentes enfermedades de origen infeccioso. Uno de los microorganismos que ha experimentado este fenómeno es *Haemophilus parasuis*, agente etiológico de la enfermedad de Glässer, así como patógeno secundario u oportunista del Complejo Respiratorio Porcino. Estos microorganismos se convierten así en responsables de importantes pérdidas económicas en la industria porcina de todo el planeta, de forma especial en los países más industrializados. Por ello, cualquier abordaje que permita un mejor conocimiento de la enfermedad de Glässer, de su prevención, de su control y de su microorganismo responsable, *H. parasuis*, podrá repercutir de forma positiva en el sector porcino.

La prevención de la enfermedad de Glässer se ha basado tradicionalmente en el empleo de bacterinas, bien sean comerciales o bien autovacunas generadas a partir de la cepa circulante en una explotación concreta. Sin embargo, a los problemas asociados a este tipo de vacunas, como la pérdida de antígenos durante los procesos de inactivación, la posibilidad de inactivación incompleta del patógeno o la imposibilidad de diferenciar entre animales vacunados y portadores, se suma, en el caso de *H. parasuis*, la escasa o nula protección cruzada demostrada entre los diferentes serotipos y cepas de la especie. La combinación de diferentes cepas en una misma formulación inactivada tampoco permite mejorar los resultados de protección porque, nuevamente, la protección se ve mayormente restringida a los dos o tres serotipos incluidos, ya que combinar más es un proceso muy complejo, sin olvidar que muchas de las cepas virulentas circulantes no pueden ser adscritas a ningún serotipo.

En los últimos años, la investigación de nuevas vacunas contra ésta bacteria se ha centrado principalmente en la valoración de las proteínas de membrana como antígenos vacunales. Esto se ha visto facilitado gracias a los avances tanto en la tecnología del ADN recombinante, que permite producir grandes cantidades de proteínas de una especie bacteriana en otras especies de manejo más sencillo en el laboratorio, como en las bases de datos y programas bioinformáticos, que permiten aplicar procesos de vacunología inversa mediante el estudio del genoma, proteoma y transcriptoma de los agentes patógenos, para intentar predecir aquellas proteínas que puedan tener valor como antígenos inmunógenos vacunales.

La ventaja de las vacunas compuestas por proteínas de membrana, y por otras subunidades bacterianas, con respecto a las bacterinas, es que son fácilmente producibles en cantidad suficiente y que, si alguna de estas formulaciones exhibe un buen grado de protección para una cepa o serotipo, la combinación de las mismas proteínas útiles de diferentes serotipos es un proceso relativamente sencillo en comparación con la combinación de bacterinas.

Relacionado con lo anterior, en la presente Tesis Doctoral se plantea que se valoren en un modelo porcino de infección experimental (cerdos privados de calostro) la capacidad protectora frente a la enfermedad de Glässer de diferentes proteínas de membrana externa de la cepa Nagasaki (cepa de referencia del serotipo virulento de mayor distribución mundial, el 5), las cuales han mostrado protección en un modelo murino de infección en estudios llevados a cabo con otras cepas.

El grupo de investigación dentro del cual se integra esta Tesis Doctoral presenta una dilatada trayectoria en el desarrollo de estudios experimentales con cerdos privados de calostro, que han sido utilizados para la valoración del poder protector de diferentes formulaciones vacunales, entre las que figuran proteínas de la membrana externa.

Además, mediante el estudio del transcriptoma de la bacteria en condiciones de cultivo *in vitro* similares a las que se suceden durante la infección en lo que a temperatura del animal y disponibilidad de hierro se refiere, se espera poder encontrar proteínas que presenten una elevada posibilidad de aparecer expresadas en una mayor cantidad sobre la superficie bacteriana durante la infección y, por lo tanto, pudiesen tener valor como antígenos vacunales en futuros estudios.

Por otro lado, todavía existe un gran desconocimiento sobre la patogenia de la enfermedad de Glässer, proceso séptico que genera poliserositis fibrinosas. Empleando las muestras sanguíneas obtenidas durante la infección experimental, se indagará en las modificaciones inducidas por *H. parasuis* en el perfil de expresión de una serie de receptores relacionados con la respuesta inmunitaria y con la instauración del fenómeno de la sepsis, que caracteriza a esta enfermedad porcina.

Como Objetivos Concretos de esta Tesis Doctoral citaremos los siguientes:

- Clonación, expresión y valoración de la eficacia protectora frente a la enfermedad de Glässer experimental (en cerdos privados de calostro), de tres proteínas de membrana externa de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, P2, P5 y D15, que han demostrado previamente un grado de protección aceptable en un modelo murino.
- Estudio de receptores relacionados con la sepsis sobre células mononucleares de sangre periférica en cerdos infectados con *Haemophilus parasuis*.
- Búsqueda mediante estudios transcriptómicos de proteínas sobreexpresadas en la superficie de *H. parasuis* en condiciones de cultivo parcialmente miméticas a la infección, como son la restricción de hierro y una temperatura febril.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. INSTALACIONES

Las técnicas generales desarrolladas en esta Tesis Doctoral fueron llevadas a cabo en laboratorios pertenecientes a la Unidad de Microbiología e Inmunología, del Departamento de Sanidad Animal, de la Universidad de León (ULE). Los procedimientos realizados en conejos para estudiar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes fueron desarrollados en el Animalario de la ULE. La cría de cerdos privados de calostro materno fue realizada durante sus fases iniciales en esas mismas instalaciones y posteriormente en una unidad experimental aislada localizada en Navafría (León) donde, además de su alojamiento, se realizaron las inmunizaciones y la infección experimental. La inspección *post mortem* y la toma de muestras de los cerdos infectados fue llevada a cabo en la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de la ULE.

Los estudios de poblaciones celulares sanguíneas mediante citometría de flujo se desarrollaron en laboratorios del grupo de “Inmunología Porcina” del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) en Madrid y en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la ULE.

3.2. MICROORGANISMOS

3.2.1. *Haemophilus parasuis*

Se utilizó la cepa Nagasaki, cepa de referencia para el serotipo 5 (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992).

3.2.2. *Escherichia coli*

Se utilizaron las siguientes cepas:

- Cepa TOP10 (Invitrogen): F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*
- Cepa LMG194 (Invitrogen): F- Δ *lacX74 gal E thi rpsL* Δ *phoA* (*Pvu* II) Δ *ara714 leu::Tn10*

3.3. ANIMALES

3.3.1. Conejos

Los estudios de caracterización inmunogénica de las proteínas recombinantes se llevaron a cabo sobre 12 conejos de raza *New Zealand* (Charles River) machos, de tres meses de edad.

3.3.1. Cerdos privados de calostro

La infección experimental con *H. parasuis* y la valoración de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes se realizaron sobre cerdos privados de calostro materno, de cruce Landrace × Duroc, procedentes de una explotación de alto estatus sanitario localizada en Villaveza del Agua (Zamora). El número de animales utilizados fue de 45.

3.4. PRODUCTOS Y REACTIVOS

3.4.1. Productos y reactivos microbiológicos generales

3.4.1.1. Medios de cultivo de *Haemphilus parasuis*

El cultivo en placa de *H. parasuis* fue realizado en agar chocolate con Vitox (Thermo Scientific, PO5090A). El cultivo líquido se llevó a cabo en caldo PPLO (*Pleuropneumonia-like organism*) (Laboratorios Conda, 1262) suplementado con D-glucosa (Sigma-Aldrich, G7528), a una concentración final del 0,075% y con NAD (dinucleótido de β -nicotamida y adenina) (Sigma-Aldrich, N7004), a una concentración final de 150 μ M.

3.4.1.2. Medios de cultivo de *Escherichia coli*

El cultivo en placa de las diferentes cepas de *E. coli* fue realizado en agar LB (Luria-Bertani) (Laboratorios Conda, 1083) suplementado, cuando fue necesario, con ampicilina (Sigma-Aldrich, A9518), a una concentración final de 100 µg/ml. El cultivo líquido se llevó a cabo en caldo LB (Laboratorios Conda, 1231) suplementado, en caso de ser necesario, con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml y/o L-arabinosa (Sigma-Aldrich, A3256), a diferentes concentraciones. Durante los procesos de transformación de la cepa TOP10 se utilizó el medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) (Thermo Scientific, 15544034).

3.4.1.3. Medio de congelación de bacterias

El medio utilizado para almacenar y conservar bacterias a -80 °C fue preparado disolviendo leche descremada en polvo (Sigma-Aldrich, 70166) al 5%, junto con triptona (Thermo Scientific, LP0042B) al 2,5% y glicerol (VWR Chemicals, 24386.298) al 20%, en agua MilliQ. Fue esterilizado mediante autoclave en un ciclo de 110 °C, 20 minutos y 1 atmósfera de presión. Posteriormente, se repartió en alícuotas de 1 ml y se conservó a -20 °C hasta su uso.

3.4.1.4. Medio de inóculo para el desafío con *Haemophilus parasuis*

Para la infección experimental de los cerdos privados de calostro, se resuspendió la masa microbiana de *H. parasuis* en medio RPMI-1640 estéril, con bicarbonato sódico y sin L-glutamina (Sigma-Aldrich, R0883).

3.4.1.5. Solución salina estéril (SSE) (NaCl 154 Mm)

Se preparó disolviendo 9 g de NaCl (Sigma-Aldrich, S7653) en 1 litro de agua MilliQ y se esterilizó en autoclave en un ciclo de 110 °C, 20 minutos y 1 atmósfera de presión.

3.4.1.6. Soluciones de *stock* de suplementos para medios de cultivo

D-glucosa (50 %)

Se preparó disolviendo 50 g de D-glucosa (Sigma-Aldrich, G7528) en 100 ml de agua MilliQ y se esterilizó con filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm (VWR, 514-0061). Se almacenó a 4 °C.

Dinucleótido de β -nicotinamida y adenina (NAD) (20 mg/ml)

Esta solución se preparó disolviendo 200 mg de NAD (Sigma-Aldrich, N7004) en 10 ml de agua MilliQ. Después se esterilizó con filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm , se repartió en alícuotas de 1 ml y se almacenó a -20 °C.

Solución de ampicilina (100 mg/ml)

Se disolvió 1 g de ampicilina (Sigma-Aldrich, A9518) en 10 ml de agua MilliQ. Se esterilizó con filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm , se repartió en alícuotas de 1 ml y se almacenó a -20 °C.

Solución de L-arabinosa (20%)

Se preparó disolviendo 20 g de L-arabinosa (Sigma-Aldrich, A3256) en 100 ml de agua MilliQ. Se esterilizó con filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm (VWR, 514-0061) y se almacenó a 4 °C.

Solución de 2,2'-dipiridilo (50 mM)

Se disolvieron 156 mg de 2,2'-dipiridilo (Sigma-Aldrich, D216305) en 20 ml de agua MilliQ. Posteriormente se esterilizó con filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm , se alícuotó en volúmenes de 1 ml y se conservó congelado a -20 °C.

3.4.2. Productos y reactivos para procedimientos con ácidos nucleicos

3.4.2.1 Cebadores

Los cebadores (Roche) utilizados se enumeran en la Tabla de la página siguiente.

NOMBRE	DIANA	SECUENCIA
trx	pBAD/Thio-TOPO	TTCCTCGACGCTAACCTG
pbadfw	pBAD/Thio-TOPO	ATGCCATAGCATTTTTATCC
pbadrv	pBAD/Thio-TOPO	GATTTAATCTGTATCAGG
n1p2	Gen <i>OmpP2</i> de <i>H. parasuis</i>	GATTTTGATGGTCAATTGCGTC
rp2	Gen <i>OmpP2</i> de <i>H. parasuis</i>	CCATAATACACGTAAACCAACACC
n1p5	Gen <i>OmpP5</i> de <i>H. parasuis</i>	GCTAAAGCTGGTTGGGCAACATTC
rp5	Gen <i>OmpP5</i> de <i>H. parasuis</i>	CATAGAAACTTCTTTGAACCTTGAACCTGG
nd15	Gen <i>OmpD15</i> de <i>H. parasuis</i>	TCAGCACTTATTGAGCATTACC
cd15	Gen <i>OmpD15</i> de <i>H. parasuis</i>	TGTCAAAGTCCCTTCTGT
hpsfw	rDNA 16S de <i>H. parasuis</i>	GTGATGAGGAAGGGTGGTGT
hpsrv	rDNA 16S de <i>H. parasuis</i>	GGCTTCGTACCCTCTGT
cyf	Gen de la ciclofilina porcina	CCTGAACATACGGGTCCTG
cyr	Gen de la ciclofilina porcina	AACTGGGAACCGTTTGTGTTG
mcpf	Gen de la MCP-1 porcina	ACCAGCAGCAAGTGTCTAAAG
mcpr	Gen de la MCP-1 porcina	GTCAGGCTTCAAGGCTTCGG
tnff	Gen del TNF- α porcino	CCTCTTCTCCTTCTCCTG
tnfr	Gen del TNF- α porcino	CCTCGGCTTTGACATTGG
il1f	Gen de la IL-1 β porcina	GGCCGCAAGATATAACTGA
il1r	Gen de la IL-1 β porcina	GGACCTCTGGGTATGGCTTTC
il6f	Gen de la IL-6 porcina	TGGCTACTGCCTCCCTACC
il6r	Gen de la IL-6 porcina	CAGAGATTTTGCCGAGGATG
il8f	Gen de la IL-8 porcina	TTCGATGCCAGTGCATAAATA
il8r	Gen de la IL-8 porcina	CTGTACAACCTTCTGCACCCA
14f	Gen del CD14 porcino	ACCACCCTCAGACTCCGTAATG
14r	Gen del CD14 porcino	TTGCGCCACTTTCAGTACCTT
163f	Gen del CD163 porcino	GCCTGTCTCATCGCATTCT
163r	Gen del CD163 porcino	GGATTTAGCATATCCGTTTCATCTG
t12f	Gen del TLR2 porcino	TCACTTGTCTAACTTATCATCCTCTTG
t12r	Gen del TLR2 porcino	TCAGCGAAGGTGTCATTATTGC
t14f	Gen del TLR4 porcino	GCCATCGTGCTAACATCATC
t14r	Gen del TLR4 porcino	CTCATACTCAAAGATACACCATCGG
t15F	Gen del TLR-5 porcino	CAGCGACCAAAACAGATTGA
T15r	Gen del TLR-5 porcino	TGCTCACCAGACAGACAACC

Tabla 7 : Cebadores utilizados en esta Tesis Doctoral

Las parejas de cebadores n1p2-rp2, n1p5-rp5 y nd15- rd15 se utilizaron para amplificar los genes de las proteínas que se caracterizaron inmunológicamente. Además, también se usaron para seleccionar los transformantes correctos en la PCR *post*-transformación y en la secuenciación. Los cebadores trx, pbadfw y pbadrv se emplearon en la secuenciación de transformantes; igualmente, pbadrv se empleó en la PCR de selección de transformantes. Los cebadores hpsfw y hpsrv se utilizaron para la confirmación de aislamiento de *H. parasuis* después de la infección experimental. Los

restantes cebadores se emplearon durante el estudio de expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta inmune mediante PCR en tiempo real.

3.4.2.2. Vector de clonación

Los genes de las proteínas objeto de estudio fueron clonados y expresados en el vector pBAD/Thio-Topo, utilizando el “pBAD/TOPO[®] ThioFusion[™] Expression Kit” (Invitrogen, K370-01).

3.4.2.3. PCR convencional

3.4.2.3.1. Amplificación de los genes de las proteínas

Reactivos utilizados:

- “Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase” (Invitrogen, 10966-026), con *Taq* polimerasa, tampón 10× y cloruro magnésico 50 mM
- Mezcla de desoxinucleótidos, 10 mM cada uno (Biotools, 20.038)

3.4.2.3.2. Amplificación del gen codificante de ARN ribosómico 16S para la detección de *Haemophilus parasuis*

Reactivos utilizados:

- “Biotools DNA Polymerase” (5 U/μl) (Biotools, 10.043), con *Taq* polimerasa y tampón 10×
- Mezcla de desoxinucleótidos, 10 mM cada uno (Biotools, 20.038)

3.4.2.4. PCR en tiempo real

Reactivos utilizados:

- “SG qPCR Master Mix (2×) Kit” (Eurx, E0401-03), que contiene una mezcla lista para usar de *Taq* polimerasa, *SYBR Green*, tampón y desoxinucleótidos

3.4.2.5. Extracción de ácidos nucleicos (ADN o ARN)

Para la extracción de ADN genómico de *H. parasuis* se utilizó el Kit “Wizard® Genomic DNA Purification” (Promega, A1125). Para la extracción de ADN plasmídico de transformantes de *E. coli* se utilizó el kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, A1460). Para la extracción de ARN bacteriano se utilizó el “High Pure RNA Isolation Kit” (Roche, 11 828 665 001). Por último, para la extracción de ARN de órganos y tejidos porcinos se utilizó el “RNeasy® Plus Mini Kit” (Qiagen, 74136).

3.4.2.6. Purificación de productos de PCR

Se utilizó el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, A9281).

3.4.2.7. Eliminación de ADN genómico en muestras de ARN

En el caso de las muestras de ARN bacteriano se utilizó el “DNA-free™ Kit” (Applied Biosystems, AM1906). Para las muestras de ARN porcino se utilizó el mismo kit que para la retrotranscripción, el “QuantiTect® Reverse Transcription Kit” (Qiagen, 205314).

3.4.2.8. Retrotranscripción

Para la retrotranscripción del ARN porcino se utilizó el “QuantiTect® Reverse Transcription Kit” (Qiagen, 205314).

3.4.2.9. Electroforesis en gel de agarosa

Tampón TAE 10×

- 49,4 g de Trizma® base (Sigma-Aldrich, T1503)
- 11,42 ml de ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, A6283)
- 20 ml de solución preparada con EDTA (Panreac, 131669) 0,5 M y pH = 8
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Para su uso se preparó TAE 1× diluyendo 1:9 en agua MilliQ.

Geles de agarosa

Se prepararon al 1% disolviendo 0,5 g de agarosa (Laboratorios Conda, 8014) en 50 ml de tampón TAE 1×.

Tampón de carga del ADN

Se utilizó el “6× DNA Loading Dye” (Thermo Scientific, R0611).

Marcador de peso molecular del ADN

Se utilizó el “GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder” (Thermo Fisher, SM0321).

Tinción de ácidos nucleicos

Se utilizó el producto RedSafe™ (Intron Biotechnology, 21141).

3.4.3. Productos y reactivos para procedimientos con proteínas

3.4.3.1. Extracción, replegado y purificación proteica

TBS (Tris-Cl 50 mM y NaCl 150 mM)

- 7,9 g de Trizma® hidroclicorada (Sigma-Aldrich, T3253)
- 8,25 g de NaCl (Sigma-Aldrich, S7653)
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Se ajustó su pH a 8.

Se trata de una formulación diferente al TBS usado para los *western blots*.

Tampones de TBS-urea

- 7,9 g de Trizma® hidroclicorada (Sigma-Aldrich, T3253)
- 8,25 g de NaCl (Sigma-Aldrich, S7653)
- Urea (Sigma-Aldrich, U5378), a diferentes concentraciones finales (8 M, 6 M, 4 M, 2 M, 1 M o 0,5 M) según el caso
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Se ajustó su pH a 8.

Solución stock de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (100 mM)

- 1,7 g de PMSF (Sigma-Aldrich, P7626) en 100 ml de agua MilliQ.

Tampón de elución (imidazol 300 mM, L-arginina 400 mM)

- 0,79 g de Trizma[®] hidrocloreada (Sigma-Aldrich, T3253)
- 0,83 g de NaCl (Sigma-Aldrich, S7653)
- 2 g de imidazol (Sigma-Aldrich, I5513)
- 8,4 g de L-arginina monohidrocloreada (Sigma-Aldrich, A5131)
- Agua MilliQ hasta 0,1 litros

Se ajustó su pH a 8.

3.4.3.2. Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Como gel de afinidad se utilizó el “HIS-Select[®] Nickel Affinity Gel” (Sigma-Aldrich, P6611) y como columnas de cromatografía, las Econo-Pac[®] (Bio-Rad, 7321010).

3.4.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Los geles utilizados para la electroforesis en gel de (SDS-PAGE) tuvieron una concentración de acrilamida/bis-acrilamida del 12 % (gel separador) y del 5 % (gel concentrador). Fueron preparados añadiendo los diferentes componentes en las cantidades indicadas en la siguiente Tabla:

CONSTITUYENTES	GEL SEPARADOR	GEL CONCENTRADOR
Agua MilliQ	4.125 ml	1.75 ml
Solución de acrilamida/bis-acrilamida al 30 % (Sigma-Aldrich, A3574)	5 ml	412,5 µl
Tris-HCl Buffer 1,5 M, pH 8,8 (Bio-Rad, 161-0798)	3.125 ml	-
Tampón Tris-HCl, 5 M, pH 6.8 (Bio-Rad, 161-0799)	-	312,5 µl
Solución de dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich, L5750) al 10 % en agua	125 µl	25 µl
Solución de persulfato amónico (Sigma-Aldrich, A3678) al 10 % en agua	125 µl	25 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Sigma-Aldrich, T9281)	5 µl	2,5 µl

Tabla 8: Geles de poliacrilamida. Cantidades necesarias para la obtención de 2,5 geles.

Tampón de electroforesis 5× (TRIS 125 mM, glicina 960 mM y SDS al 0,5%)

- 15 g de Trizma® base (Sigma-Aldrich, T1503)
- 72 g de glicina (Sigma-Aldrich, G8898)
- 5 g de solución de dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich, L5750)
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Se ajustó su pH hasta 8,3.

Tampón de electroforesis 1× (TRIS 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%)

Se preparó diluyendo 1:4 el tampón de electroforesis 5x.

Tampón de carga de proteínas

Se utilizó el “2× Laemmli Sample Buffer” (Bio-rad, 161-0737).

Marcador de pesos moleculares de las proteínas

Se utilizó el “Precision Plus Protein™ Standards Dual Color” (Bio-rad, 161-0374).

Solución de teñido

- 1 g de azul de Coomassie
- 400 ml de metanol (Sigma-Aldrich, 32213)
- 100 ml de ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, A6283)
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Solución de desteñido

- 400 ml de metanol (Sigma-Aldrich, 32213)
- 100 ml de ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, A6283)
- Agua MilliQ hasta 1 litro

3.4.3.4. Western Blot

Tampón de transferencia 10× (TRIS 250 mM, glicina 1,92 M)

- 30 g de Trizma[®] base (Sigma-Aldrich, T1503)
- 144 g de glicina (Sigma-Aldrich, G8898)
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Tampón de transferencia 1× (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%)

- 100 ml de tampón de transferencia 10×
- 200 ml de metanol (Sigma-Aldrich, 32213)
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Se preparó inmediatamente antes de su uso.

TBS 10× (TRIS 190 mM, NaCl 1,37 M, KCl 25 mM)

- 30 g de Trizma[®] hidrociorada (Sigma-Aldrich, T3253)
- 80 g de NaCl (Sigma-Aldrich, S7653)
- 2 g de KCl (Sigma-Aldrich, P9541)
- Agua MilliQ hasta 1 L

Se ajustó su pH a 8.

Se trata de una formulación diferente al TBS utilizado durante la extracción proteica.

TBS 1× con leche descremada al 5% (TRIS 19 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,5 mM y leche descremada al 5%)

- 10 ml de TBS 10×
- 5 g de leche descremada en polvo (Sigma-Aldrich, 70166)
- Agua MilliQ hasta 100 ml

Utilizado para el bloqueo de la membrana y para la dilución de los anticuerpos.

Tampón de lavado de la membrana

- 0,5 ml de Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich, P1379)
- 100 ml de TBS 10×
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Membrana de transferencia

- Membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific, 88018)

Anticuerpos comerciales conjugados con la enzima peroxidasa

- Anticuerpo anti IgG de conejos, producido en cabra y conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, A6154)
- Anticuerpo anti IgG de cerdo, producido en conejo y conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, A5670)

Sustrato de la enzima peroxidasa

- “Pierce[®] ECL Plus Western Blotting Substrate” (Thermo Scientific, 32132).

Película de revelado

- “Amersham Hyperfilm[®] ECL” (GE Healthcare, 28906836).

Líquidos para revelado de película

- Revelador (Rodinal, AGFA)
- Lavado (Agua destilada)
- Fijador (Agefix, AGFA)

3.4.4. Productos y reactivos para la preparación de los antígenos vacunales

Adyuvante

Se utilizó Montanide IMS 2215 VG PR (Seppic, 36031P).

Tampón acetato sódico (0,1 M, pH 6)

- 0,82 g de acetato sódico (Panreac, 131633)
- Agua MilliQ hasta 100 ml
- Se ajustó su pH a 6

Se esterilizó utilizando filtros de acetato de celulosa, con un tamaño de poro de 0,2 μm (VWR, 514-0061).

3.4.5. Productos y reactivos para citometría de flujo

3.4.5.1 Aislamiento de células mononucleares sanguíneas de sangre periférica (PBMCs)

Gradiente de concentración

Se utilizó Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich, 10771).

Solución de lavado

- 20 ml de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, F2442).
- “Dulbecco’s phosphate buffered saline” (DPBS) modificado sin CaCl_2 ni MgCl_2 (Sigma-Aldrich, D8537), hasta 1 litro.

Se trata de productos estériles, mezclados bajo condiciones asépticas en cabina de seguridad biológica.

Medio de congelación

- 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, D2650).
- 90 ml de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, F2442).

Se trata de productos estériles, mezclados bajo condiciones asépticas en cabina de seguridad biológica.

3.4.5.2. Tinción de PBMCs para su recuento al microscopio

Solución de azul de tripán 10× (stock)

- 1,25 g de azul de tripán (Sigma-Aldrich, T6146).
- “Phosphate buffered saline” (PBS) sin calcio ni magnesio (Lonza, BE17-516Q), hasta 100 ml.

Solución de azul de tripán 1× (solución de uso)

Se diluyó la solución anterior en PBS hasta una proporción 1:9. Se filtró posteriormente a través de filtros de acetato de celulosa, con un tamaño de poro de 0,2 μm de diámetro (VWR, 514-0061).

3.4.5.3. Tampones para citometría de flujo

Solución de azida sódica al 10% en PBS (stock)

- 1 g de azida sódica (Sigma-Aldrich, S2002).
- “Phosphate buffered saline” (PBS) sin calcio ni magnesio (Lonza, BE17-516Q), hasta 10 ml

Tampón FACS (BSA al 0,1%, azida sódica al 0,01%)

- 1 g de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, A9647).
- 1 ml de azida sódica al 10 % en PBS.
- “Phosphate Buffered Saline” (PBS) sin calcio ni magnesio (Lonza, BE17-516Q), hasta 1 litro.

Se esterilizó con filtros de 0,45 μm y se conservó a 4 °C.

Tampón FACS-fijador (BSA al 0,1%, azida sódica al 0,01%, formaldehído al 0,1%)

- 1 g de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, A9647).
- 1 ml de azida sódica al 10 % en PBS.
- 2,7 ml de formaldehído al 37% en agua (Sigma-Aldrich, 252549).
- “Phosphate buffered saline” (PBS) sin calcio ni magnesio (Lonza, BE17-516Q), hasta 1 litro.

Se esterilizó con filtros de 0,45 μm y se conservó a 4 °C.

3.4.5.4. Anticuerpos empleados en citometría de flujo

Anticuerpos primarios

ABREVIATURA	CLON	DIANA	ISOTIPO	REFERENCIA
α TLR2-IgG1	1H11	TLR-2 porcino	IgG1 de ratón	Álvarez <i>et al.</i> , 2008
α TLR4-IgM	3H3	TLR-4 porcino	IgM de ratón	Álvarez <i>et al.</i> , 2006
α SIGLEC1-IgG2a	1F1/CR4	Siglec-1 porcino	IgG1 de ratón	Revilla <i>et al.</i> , 2009
α SIGLEC3-IgG1	5D5	Siglec-3 porcino	IgG1 de ratón	Álvarez <i>et al.</i> , 2015
α SIGLEC5-IgG1	4F7	Siglec-5 porcino	IgG1 de ratón	Escalona <i>et al.</i> , 2014
α SIGLEC10-IgG1	2E9	Siglec-10 porcino	IgG1 de ratón	Escalona <i>et al.</i> , 2015
α CD163-IgG2a	1C6/BM	CD163 porcino	IgG2a de ratón	Pérez <i>et al.</i> , 2008
α CD163-IgG1	2A10/11	CD163 porcino	IgG1 de ratón	Sánchez <i>et al.</i> , 1999
α PMN-IgG2a	6D10	Granulocitos	IgG2a de ratón	Pérez <i>et al.</i> , 2007
α CD172a-IgG2b	74-22-15a	CD172a porcino	IgG2b de ratón	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984

Tabla 9: Anticuerpos primarios empleados en la citometría de flujo. Todos ellos fueron sobrenadantes producidos y cedidos por el grupo de Inmunología Porcina del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Anticuerpos primarios irrelevantes

CLON	ISOTIPO
4B9	IgG1 de ratón
1D9	IgG2a de ratón
3E4	IgG2b de ratón
7E10	IgM de ratón

Tabla 10: Anticuerpos irrelevantes primarios empleados en la citometría de flujo. Todos ellos, excepto el 7E10 que era comercial, fueron sobrenadantes producidos y cedidos por el Grupo de Inmunología Porcina del INIA.

Anticuerpos secundarios conjugados

ABREVIATURA	DIANA	ORIGEN	CONJUGADO	CASA COMERCIAL
RAM-IgG1-Fitc	IgG1 de ratón	Rata	FITC	BD Pharmigen (A85-1)
RAM-IgG1-Fitc	IgG1 de ratón	Rata	FITC	Southern Biotech (1144-02)
GAM-IgG2a-Fitc	IgG2a de ratón	Cabra	FITC	Southern Biotech (1080-02)
GAM-IgG2a-APC	IgG2a de ratón	Cabra	APC	Southern Biotech (1080-11)
GAM-IgG2b-APC	IgG2b de ratón	Cabra	APC	Southern Biotech (1090-11)
GAM-IgM-Fitc	IgM de ratón	Cabra	FITC	Southern Biotech (1020-02)

Tabla 11: Anticuerpos secundarios conjugados empleados en la citometría de flujo.

3.4.6. Productos y reactivos para la técnica ELISA

3.4.6.1. Tampones y soluciones

Tampón fosfato salino con Tween-20, para lavado (NaCl 0,131 mM, Na₂HPO₄ 1,7 mM, KH₂PO₄ 2 mM y Tween-20 al 0,25%)

- 7,65 g de NaCl (Sigma-Aldrich, S7653).
- 0,24 g de Na₂HPO₄ (Panreac, 131679).
- 0,27 g de KH₂PO₄ ((Sigma-Aldrich, P5379).
- 2,5 ml de Tween[®]-20 (Sigma-Aldrich, P1379).
- Agua MilliQ hasta 1 litro.

Tampón carbonato para tapizado de las placas (Na₂CO₃ 150 mM, Na₂HPO₄ 1,7 mM, KH₂PO₄ 2 mM y Tween-20 al 0,25%, pH 9,6)

- 3,18 g de Na₂CO₃.
- 5,86 g de NaHCO₃.
- Agua MilliQ hasta 200 ml.

Se ajustó el pH a 9,6. Se esterilizó con filtros de acetato de celulosa, con un tamaño de poro de 0,2 µm y se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Tampón de bloqueo y dilución de los anticuerpos (TBS-Tween-20 + leche al 5%)

- 5 g de leche descremada en polvo (Sigma-Aldrich, 70166).
- 100 ml de PBS-Tween-20.

Solución de ácido cítrico al 0,1 M

- 0,384 g de C₆H₈O₇.
- 20 ml de agua MilliQ.

Se preparó inmediatamente antes de su uso.

Tampón de citrato / acetato (acetato sódico 100 mM, pH 6)

Se disolvieron 0,82 g de acetato sódico en 80 ml de agua MilliQ. Se ajustó el pH a 6 con una solución de ácido cítrico al 0,1 M y se enrasó hasta los 100 ml con agua MilliQ. Se esterilizó con filtros de acetato de celulosa, con un tamaño de poro de 0,2 µm y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Solución de TMB (40 mM) en DMSO

- 0,1 g de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, D2650).

Se conservó en oscuridad a temperatura ambiente.

Solución de sustrato para la peroxidasa (volumen suficiente para una placa de ELISA)

- 10 ml de tampón acetato / citrato
- 0,1 ml de solución de TMB
- 3 µl de H₂O₂

Se preparó inmediatamente antes de su uso.

Solución de frenado (H₂SO₄, 1 M)

- 5,67 ml de H₂SO₄ al 96 % (Panreac 131058).
- 94,33 ml de agua MilliQ.

3.4.6.2. Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa

- Anticuerpo anti-IgG de conejos, producido en cabra y conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, A6154).
- Anticuerpo anti-IgG de cerdo, producido en conejo y conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, A5670).

3.5. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS “ON-LINE” Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS

3.5.1. Estudio y clonaje de las proteínas OMP P2, P5 y D15

Base de datos de secuencias

Las secuencias de los genes y proteínas estudiadas fueron obtenidas de la base de datos “GenBank” del *National Institute of Health* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), de los Estados Unidos de América.

Predicción de dominios

Se utilizó la herramienta “InterProScan” para encontrar dominios en las proteínas estudiadas. Herramienta accesible en la página <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>.

Predicción de péptidos señal

Se utilizó el servidor “SignalP 4.1”, el cual permite predecir la localización de péptidos señal. Accesible en la página <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Estudio del barril β de las proteínas de membrana externa

Para conocer las regiones de las proteínas de membrana externa expuestas al exterior se utilizó el programa “PRED-TMBB”, herramienta accesible en <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/>.

Predicción de epítomos

Se utilizó la herramienta “ProPred-I”, disponible en <http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/>.

Diseño de los cebadores

Se utilizó el programa “Oligo Calc”, tanto para el diseño de las secuencias de los cebadores como para el cálculo de las temperaturas de fusión. Se encuentra accesible en la página web <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.

Alineamiento de secuencias

Se utilizó el programa “Lalign”, que permite la realización de alineamientos entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas. Accesible en el portal del servidor ExPASy (<http://www.expasy.org>).

Traducción de las secuencias nucleotídicas a secuencias aminoacídicas

Se utilizó el programa “Translation utility”, herramienta de la Universidad de Ghotenburg. Accesible en la página <http://bio.lundberg.gu.se/>.

Cálculo de las secuencias reversas complementarias

Se utilizó el programa “Reverse Complement”, herramienta accesible en <http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>.

Predicción del peso molecular de las proteínas

Se utilizó la herramienta “Protein Molecular Weight”, accesible en http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/protein_mw.html.

3.5.2. Citometría de flujo

Para seleccionar una correcta combinación de fluorocromos, en función de los filtros y láseres del citómetro, se utilizó la página web <http://m.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer>.

3.5.2.1. Análisis de datos de la citometría de flujo

Para los análisis definitivos de los datos de citometría de flujo se utilizó el programa “Flowjo® V10”.

3.5.3. PCR en tiempo real

El programa utilizado para las PCRs en tiempo real fue el “Realplex Software V2.2”.

3.5.4. Estudio del transcriptoma por *RNA sequencing*

Control de calidad de lecturas brutas

Para el control de calidad de las lecturas brutas se empleó “FastQC”.

(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)

Alineamiento con el genoma de referencia

Se realizó empleando “TopHat”.

(<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>)

Ensamblado y fusión de transcritos y análisis de genes expresados diferencialmente

Se empleó el paquete Cufflinks.

(<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>)

Localización celular de proteínas

Se empleó la herramienta web “CELLO” accesible en <http://cello.life.nctu.edu.tw/>

Identificación de proteínas relacionadas con la patogenicidad

Se empleó la herramienta “MP3” accesible en <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>

Análisis de enriquecimiento funcional

Se empleó el servidor web “DAVID” accesible en <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>

3.5.5. Análisis estadísticos

Se utilizó el programa “SPSS” (IBM), utilizando en cada una de las técnicas llevadas a cabo el estadístico adecuado. Para comprobar si los datos de los diferentes estudios seguían o no una distribución normal y así poder seleccionar el estadístico más apropiado, se recurrió al test de Shapiro-Wilk, considerando que se seguía una distribución normal si el valor de p era superior a 0,05.

En el caso de la citometría se utilizó la prueba t de Student para muestras relacionadas, al comparar las intensidades de expresión de los diferentes marcadores entre antes y después de la infección. En el caso de la PCR en tiempo real se empleó la prueba t de Student para muestras independientes, al objeto de conocer si existían diferencias significativas entre la expresión de los diferentes genes entre los animales no inmunizados y los animales inmunizados con las tres proteínas.

Para los ELISAs se utilizó la prueba t de Student para muestras relacionadas, a la hora de comparar la densidad óptica entre los diferentes tiempos o la prueba t de Student para muestras independientes, cuando la prueba se realizaba entre dos grupos diferentes de animales, en un mismo momento. Se tomó en cuenta la existencia de diferencias significativas cuando el valor de p era inferior a 0,05.

Con los datos del *RNA sequencing*, las herramientas con las que se realizaron los análisis de expresión diferencial de genes y de enriquecimiento funcional emplean un test-t corregido mediante Benjamini- Hochberg.

3.6. PROTOCOLOS DE TÉCNICAS HABITUALES

3.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizaron utilizando una cubeta “Mini-PROTEAN® Tetra Cell” (Bio-Rad) y una fuente de energía “PowerPac Basic” (Bio-Rad), con tampón de electroforesis 1×. Las muestras proteicas se diluyeron 1:1 en tampón de carga. El volumen de carga en cada pocillo fue de 15 µl de la mezcla anterior. La corriente utilizada durante las electroforesis fue de 120 V durante 2 horas.

Al finalizar cada electroforesis, los geles fueron teñidos mediante la incubación a temperatura ambiente durante varias horas en la solución de teñido, en un dispositivo

que aplicaba un movimiento de oscilación lento. Transcurrido ese tiempo se destiñeron incubándolos en una solución de desteñido durante varias horas, retirando la solución cada vez que se consideraba saturada de colorante y remplazándola por una nueva.

3.6.2. ELISA indirecto

3.6.2.1. Tapizado de placas con las proteínas recombinantes

Con cada una de las proteínas recombinantes se tapizaron varias placas de ELISA. Para ello se añadió a cada pocillo de 100 µl de tampón carbonato de pH 9,6 con 10 µg de proteína recombinante (la dilución de las proteínas en el tampón carbonato se llevó a cabo inmediatamente antes de proceder al tapizado). Se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C y luego toda la noche a 4°C, con oscilación lenta. Transcurrido ese tiempo se eliminó el contenido de los pocillos y se efectuaron 3 lavados con PBS-Tween-20. A continuación, se bloquearon los pocillos mediante la incorporación a cada uno de 200 µl de tampón de bloqueo e incubando durante 2 horas a 37 °C, con movimiento de oscilación lento. Se eliminó el contenido de los pocillos y se realizaron 3 lavados adicionales con PBS-Tween20. Las placas tapizadas se utilizaron en el momento o se congelaron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

3.6.2.2. Tapizado de placas con bacterias inactivadas

Para proceder a la inactivación de las bacterias se partió de un cultivo de la cepa Nagasaki de *H. parasuis* en 200 ml de caldo PPLO enriquecido con glucosa y NAD, con una densidad óptica de 0,4 a 600 nm de longitud de onda. Se centrifugó durante 20 minutos a 18.000× g a 7 °C para posteriormente resuspender el sedimento en 40 ml de solución salina estéril. La inactivación se llevó a cabo incorporando 4 ml de una solución de thimerosal al 1% (concentración final del 0,1%) e incubando inicialmente durante 2 horas a 37 °C y después durante toda la noche a 4 °C, en ambos casos con movimiento de oscilación lento. Se ajustó la concentración proteica con tampón carbonato de pH 9 a 13 µg/0,1 ml y se tapizaron las placas añadiendo 13 µg de proteína a cada pocillo, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior.

3.6.2.3. Adición de los sueros y conjugado: desarrollo del ELISA indirecto

El suero fue diluido en PBS-Tween-20 con leche descremada al 5%. Las diluciones utilizadas se indican más adelante, según el caso. A cada pocillo se le añadieron 100 µl de suero diluido y se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C y movimiento de oscilación lento. Con posterioridad, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween-20. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl del anticuerpo secundario conjugado correspondiente, diluido convenientemente en PBS-Tween-20 con leche descremada al 5%. Se volvieron a incubar las placas durante 1 hora a 37 °C con movimiento lento de balanceo y se realizaron 3 últimos lavados con PBS-Tween-20.

Para el revelado se añadió a cada pocillo 100 µl de la solución del sustrato para la peroxidasa, que contenía TMB y H₂O₂, y se incubó en oscuridad durante 1 minuto. Para frenar la reacción se añadió a cada pocillo 50 µl de una solución 1M de H₂SO₄. Por último, se efectuó la lectura de la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro “Multiskan Go” (Thermo Scientific).

3.6.3. Western blott

Para los *western blots* se realizó primeramente una electroforesis en gel de poliacrilamida, sus bandas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, sobre la que se realizó el *western blot* propiamente dicho. A continuación se relatan los pasos realizados en cada uno de los *western*.

3.6.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) previa

Previamente a cada *western blott* se realizaron 2 geles idénticos en SDS-PAGE, destinando uno de ellos a ser teñido y el otro a la realización del *western blot*.

3.6.3.2. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

La membrana de nitrocelulosa y el gel se introdujeron en un *casette* de transferencia, que fue insertado en una cubeta “Mini Potean II” (Bio-Rad) rellena de tampón de transferencia 1× y conteniendo una camisa con hielo. Se aplicó una corriente de 100 V durante 1 hora a 4 °C, recurriendo como fuente de alimentación al dispositivo “PowerPac Basic” (Bio-Rad).

3.6.3.3. Bloqueo de membrana de nitrocelulosa

Inmediatamente después de realizar la transferencia, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa mediante su incubación en TBS 1× con leche descremada al 5% durante 3 horas a 37 °C, o toda la noche a 4 °C, aplicando una oscilación lenta. Posteriormente, se lavó 4 veces con tampón de lavado de membrana.

3.6.3.4. Realización del *Western blot*

El suero se diluyó en TBS 1× con leche descremada al 5%, a una dilución adecuada, que se indica más adelante según el caso, y se utilizaron 20 ml de suero diluido para incubar la membrana durante 60 o 90 minutos, a 37 °C y movimiento lento de oscilación. Transcurrida esta etapa, la membrana fue lavada 4 veces con tampón de lavado de membrana.

Se incubó la membrana de nitrocelulosa en 20 ml de anticuerpo conjugado, diluido convenientemente en TBS 1× con leche descremada al 5% durante 60 o 90 minutos, a 37 °C y movimiento de oscilación lento. A continuación, se volvieron a realizar 4 lavados.

Para revelar la membrana se añadió el sustrato “Pierce® ECL Plus Western Blotting”, según las especificaciones del fabricante. En un cuarto oscuro, se colocó la membrana en un *cassette* de rayos X junto con una película de revelado. Después de un periodo de exposición adecuado, la película fue sumergida en solución de revelado durante no más de 90 segundos, luego lavada con agua destilada y después en la solución de fijado. Por último, se lavó la película con agua destilada.

3.7. VALORACIÓN DE TRES PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE LA CEPA NAGASAKI DE *Haemophilus parasuis* COMO ANTÍGENOS VACUNALES CONTRA LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER EN CERDOS

3.7.1. Producción de proteínas de membrana externa recombinantes

3.7.1.1. Estudio bioinformático preliminar de las proteínas

Previamente al diseño de los cebadores se realizó un estudio por medio de herramientas bioinformáticas para recabar información sobre las proteínas que se deseaban clonar. Las secuencias aminoacídicas de las proteínas OmpP2 y OmpP5 de la cepa Nagasaki de *H. parasuis* se obtuvieron a partir de la base de datos del “Genbank”, con sus números de acceso ACX55073.1 y EPZ99109.1, respectivamente. En el caso de la OmpD15, al no estar secuenciada en la cepa Nagasaki, se trabajó inicialmente con la secuencia de la cepa SH0165, con el número de acceso ACL32859.1.

Con las tres secuencias proteicas se realizó una búsqueda por homología de secuencia de los dominios más probables, utilizando el programa InterProScan. También se confirmó su localización en la membrana externa con el programa “PSORTb”. En las regiones transmembrana de barril β se buscaron los lazos expuestos al espacio extracelular con el programa “PRED-TMBB” y, sobre ellos se llevó a cabo una predicción de epítomos, mediante el uso de la herramienta “ProPred-I”.

Finalmente, se realizó una comparación entre las cepas Nagasaki y SH0165, en cuanto a la predicción de epítomos sobre los lazos extracelulares en las proteínas OmpP2 y OmpP5 (números de acceso respectivos para la cepa SH0165: ACL31860.1 y ACL33726.1). Esta comparación también se llevó a cabo, posteriormente, en la OmpD15, una vez que se obtuvo su secuencia en la cepa Nagasaki.

3.7.1.2. Cultivo de *Haemophilus parasuis* para la extracción de su ADN

El cultivo de la cepa Nagasaki de *H. parasuis* se realizó en agar chocolate, incubando entre 24 y 48 horas a 37 °C, con un 5% de CO₂. Después de obtener colonias aisladas, se sembraron en caldo PPLO suplementado con glucosa y NAD, para

incubarse posteriormente toda la noche a 37 °C y 150 rpm. A partir de este crecimiento en caldo, se extrajo ADN utilizando el “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”, siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.7.1.3. Diseño de los cebadores y amplificación de los genes

3.7.1.3.1. Diseño de los cebadores

A partir de la base de datos “GenBank” se obtuvieron las secuencias de los genes *OmpP2* y *OmpP5* de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, con números de acceso HM172010.1 y HM172042.1, respectivamente, y del gen *OmpD15* de la cepa SH0165, con número de acceso CP001321.1 | :1243543-1245960. Utilizando el programa “Oligo Calc”, se diseñaron los cebadores necesarios, tanto para la amplificación de los fragmentos génicos que se deseaban clonar, como para ser utilizados en la posterior secuenciación de los transformantes. Los cebadores diseñados para la amplificación del gen *OmpP2* fueron los n1p2 y rp2; para el *OmpP5*, los n1p5 y rp5, y para el *OmpD15*, los nd15 y cd15 (Tabla 7).

3.7.1.3.2. Elección de la temperatura de anillamiento

El mismo programa fue utilizado para calcular las temperaturas de fusión, tanto de los cebadores como de los amplicones resultantes, datos necesarios para el cálculo de la temperatura de anillamiento más adecuada para la amplificación de los fragmentos génicos por PCR. Este cálculo de la temperatura de anillamiento se llevó a cabo aproximándose lo máximo posible a la siguiente fórmula:

$$T^a \text{ óptima de anillamiento} = 0.3 \times T^a \text{ melting cebador más baja} + 0.7 \times T^a \text{ melting amplicón} - 14.9$$

3.7.1.3.3. PCRs de amplificación de los fragmentos génicos de interés

Las PCRs convencionales se realizaron en un termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf). Las muestras consistieron en ADN de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*. La mezcla maestra para las PCR se preparó con los reactivos especificados previamente, siguiendo la fórmula expuesta en la Tabla 12.

REACTIVO	VOLUMEN
Agua libre de DNAsas	37,5 μ l
Tampón de la <i>Taq</i> polimerasa	5 μ l
MgCl ₂	1,5 μ l
Cebador <i>forward</i>	1 μ l
Cebador <i>reverse</i>	1 μ l
desoxinucleótidos	0,5 μ l
<i>Taq</i> polimerasa (Platinum®)	0,5 μ l
Muestra de ADN	3 μ l

Tabla 12: Mezcla maestra de PCR convencional para amplificar genes a clonar. Se muestran los volúmenes de reactivos que añadir para una única reacción de amplificación, con un volumen final de 50 μ l.

En el programa del termociclador se utilizó un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación. En la desnaturalización de los ciclos se empleó una temperatura de 94 °C durante 1 minuto. En el paso de anillamiento de los ciclos, se aplicó durante 1 minuto una temperatura de 56 °C para la amplificación de *OmpP2*, o de 58 °C para la amplificación de *OmpP5* y *OmpD15*. En el paso de elongación de los ciclos se utilizó una temperatura de 72 °C durante 3 minutos. Después de los ciclos se aplicó un paso de elongación final de 30 minutos a 72 °C.

Los tamaños correctos de los amplicones fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando una cubeta “MINI-SUB® CELL GT” (Bio-Rad), una fuente de alimentación “PowerPac Basic” (Bio-Rad) y el marcador de peso molecular “GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder”.

3.7.1.4. Clonación de los fragmentos génicos amplificados en *Escherichia coli*

TOP10

El *kit* utilizado, tanto para la clonación de los amplicones como para su expresión fue el “pBAD/TOPO® ThioFusion™ Expression Kit”, que utiliza el vector “pBAD/Thio-TOPO®”, plásmido que contiene un promotor P_{BAD} y un gen *araC* con el fin de permitir el control de la expresión mediante arabinosa. Además, posee un origen pUC para permitir su replicación en un gran número de copias en *E. coli* y porta el gen de resistencia a la ampicilina, mediante el cual resulta posible la selección de las bacterias transformadas.

Este vector permite la expresión de la proteína de interés fusionada por su extremo N-terminal a una HP-thioredoxina, lo que favorece la traducción proteica de toda la proteína de fusión resultante y, en algunos casos, la solubilización y purificación. Por su extremo C-terminal, la proteína de interés irá fusionada a un epítipo V5, para su posterior reconocimiento mediante *Western blot* con anticuerpo comercial anti-V5 en caso de ser necesario, y seguidamente a una cola de 6 histidinas para su purificación mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (níquel) (Figura 5).

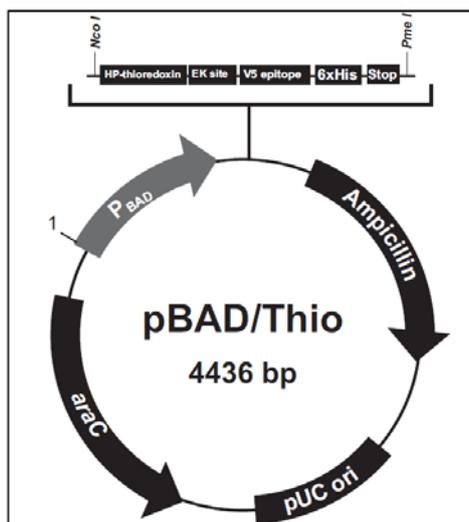


Figura 5: Estructura del vector pBAD/Thio-TOPO®.

3.7.1.5. Purificación de amplicones

Previamente a su inserción en plásmidos, los productos de PCR procedentes de las amplificaciones de los 3 fragmentos génicos fueron purificados con el *kit* “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System”, siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.7.1.6. Inserción de los fragmentos génicos en los vectores de expresión

Siguiendo las especificaciones del *kit* de clonación, el producto de PCR purificado de cada fragmento fue insertado en el vector, mediante la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, de una mezcla de vector pBAD/Thio-TOPO®, tampón comercial y producto de PCR. Una vez transcurridos los 5 minutos se pasó la reacción a hielo para inmediatamente continuar con el siguiente paso, la transformación.

3.7.1.7. Transformación de *Escherichia coli* TOP10

Se añadieron 2 µl de la reacción de inserción del paso anterior a un vial comercial de células *E. coli* TOP10 competentes, previamente descongelado en hielo, y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se aplicó un choque térmico de 1 minuto a 42°C, utilizando un bloque térmico, para inmediatamente sumergirlo en hielo. A continuación, se añadieron al vial 250 µl de medio de cultivo SOC disponiéndolo en un agitador orbital, se incubó durante 1 hora a 37 °C y 200 rpm. Transcurrido ese tiempo, se sembraron en superficie 25, 75 y 150 µl de cultivo en SOC sobre placas de agar LB con 100 µg / ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La siembra con diferentes volúmenes se realizó con el fin de asegurar que al día siguiente se obtuvieran placas con una densidad adecuada de colonias.

3.7.1.8. Selección de los transformantes de *Escherichia coli* TOP10

A las 24 horas de incubación, se seleccionaron varias colonias aisladas y se resembraron cada una en una placa de agar LB con ampicilina (100 µg/ml) y se volvieron a incubar 24 horas a 37 °C. Una vez efectuado este pase, se seleccionó una colonia de cada placa, se resembró en 10 ml de caldo LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó durante toda la noche a 37 °C y 200 rpm para poder proceder a la extracción de los plásmidos.

Finalizada la incubación y comprobado el crecimiento, se llevó a cabo la extracción plasmídica con el *kit* “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de plásmidos se verificaron mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para estas PCRs se utilizó como cebador *forward* el de los fragmentos clonados (n1p2 para el *OmpP2*, n1p5 para el *OmpP5* y nd15 para el *OmpD15*) y como cebador *reverse* el pbadrv, el cual hibrida corriente abajo de la señal de parada del plásmido recombinante. Esta combinación de cebadores permitía conocer si los plásmidos extraídos de las colonias de transformantes contenían el fragmento génico insertado en el sentido correcto, debido a que la probabilidad de que el fragmento se insertara en el sentido incorrecto era del 50 %.

En la PCR de selección de transformantes se utilizó la misma mezcla maestra que la descrita con anterioridad para las amplificaciones de los fragmentos genéticos, a

partir del ADN de *H. parasuis*, y un programa de termociclador prácticamente idéntico, con la única diferencia de que la temperatura de anillamiento utilizada en este caso fue de 55°C.

Las muestras de plásmidos que resultaron positivas a la PCR fueron secuenciadas utilizando el *kit* “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems) y el secuenciador “Abi 3130xl Genetic Analyzer” (Applied Biosystems), en el servicio del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Los cebadores seleccionados para la secuenciación fueron los utilizados para la amplificación inicial de los fragmentos génicos (n1p2 y rp2 para el vector con el gen *OmpP2*, n1p5 y rp5 para el vector con el *OmpP5* y nd15 y cd15 para el vector con el *OmpD15*), pbadv, citado anteriormente, y otros dos cebadores, trx y pbadfw, que hibridaban corriente arriba del fragmento insertado. Con el uso de todos estos cebadores, se garantizaba cubrir con dos lecturas, como mínimo, la longitud total de los fragmentos insertados, incluyendo sus regiones flanqueantes, lo cual resultaba necesario para verificar que no se perdiese el marco de lectura ni la señal de parada (Figura 6).

3.7.1.9. Transformación de *Escherichia coli* LMG194 con los vectores de expresión

3.7.1.9.1. Preparación de células competentes de *Escherichia coli* LMG194

Se añadieron 300 µl de cultivo de una noche de *E. coli* LMG194 a 30 ml de caldo LB, se cultivó en un agitador orbital a 37 °C y 200 rpm y se monitorizó la densidad óptica a 600 nm, con un espectrofotómetro “Multiskan Go” (Thermo Scientific). Al alcanzar una densidad óptica de entre 0,4 y 0,5 se incubó el crecimiento en hielo durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C y 4.500× g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 15 ml de CaCl₂ 50 mM frío (mantenido en hielo). Se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 4 °C y a 4.500× g y se resuspendió el sedimento en 1,5 ml de CaCl₂ 50 mM frío para, a continuación, incubar 3 horas en hielo. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 0,48 ml de glicerol puro frío, y la mezcla se repartió en alícuotas de 200 µl, que se conservaron por congelación a -80 °C hasta su utilización.

3.7.1.9.2. Transformación de *Escherichia coli* LMG194 y selección de transformantes

Se añadieron 10 µl de vector (extraído del transformante de TOP10 correspondiente) a un vial con 200 µl de *E. coli* LMG194 competentes, previamente descongelado en hielo. Se incubó 30 minutos en hielo y, a continuación, se sometió a un choque térmico de 42 °C durante 1 minuto. Seguidamente, se añadió 1 ml de caldo LB y se dispuso en un agitador orbital a 37 °C y 200 rpm durante 1 hora, antes de sembrar en superficie 3 placas de agar LB con ampicilina (100 µg/ml), con volúmenes de 25, 75 o 150 µl. Al día siguiente, se seleccionaron varias colonias y se siguió con ellas el mismo procedimiento que el descrito previamente para los transformantes de TOP10, es decir, fueron validadas por PCR con el cebador *forward* del inserto y el cebador *pbadrv*. Las muestras positivas fueron enviadas a secuenciar. Los transformantes correctos fueron conservados por congelación a -80 °C.

3.7.1.10. Producción de las proteínas recombinantes

A continuación, se describen los procedimientos llevados a cabo para inducir y extraer proteína recombinante a partir de un volumen de 600 ml de cultivo. Debe advertirse que tuvieron que repetirse varias veces con cada una de las 3 proteínas, con el fin de disponer de una cantidad suficiente, necesaria para llevar a cabo los estudios posteriores.

3.7.1.10.1. Inducción de la expresión proteica

Se inocularon 6 ml de cultivo de 18 horas del transformante correspondiente de *E. coli* LMG194 en 600 ml de caldo LB con ampicilina (100 µg/ml). Se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0,4, aproximadamente. Alcanzada esa densidad, para inducir la expresión proteica se añadieron 2,25 ml de una solución de arabinosa al 20% hasta alcanzar una concentración final del 0,075%, previamente establecida como la de mayor rendimiento proteico, y se incubó a 37°C y 200 rpm durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se frenó el crecimiento introduciendo el cultivo en hielo.

3.7.1.10.2. Extracción proteica

Todo el volumen del crecimiento se centrifugó durante 14 minutos a 18.000× g y 4 °C en una centrífuga “5810 R” (Eppendorf) y el sedimento resultante fue resuspendido en un volumen final de 12 ml de TBS (Tris-Cl 50 mM y NaCl 150 mM). Se añadieron 120 µl de solución de *stock* de PMSF, para obtener una concentración final de 1 mM. En un sonicador “Barnson Sonifier” (WWR) se aplicaron 4 ciclos de 40 segundos sobre la resuspensión, incubando 1 minuto en hielo entre cada ciclo. Al terminar, se incubó 15 minutos en hielo y se centrifugó durante 7 minutos a 18.000× g y 4 °C.

El sobrenadante fue recogido como la fracción proteica soluble mientras que el sedimento fue resuspendido en 12 ml de TBS con urea 8 M e incubado 15 minutos en hielo. A continuación, se centrifugó la resuspensión durante 7 minutos a 18.000× g y 4 °C para recoger el sobrenadante como fracción proteica insoluble. Las fracciones soluble e insoluble fueron estudiadas mediante SDS-PAGE para verificar la presencia de la proteína de interés.

3.7.1.10.3. Purificación proteica mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Debido a que las proteínas recombinantes portaban una cola de histidina, la purificación proteica pudo llevarse a cabo mediante una IMAC utilizando una resina con níquel. Para ello, se añadió la resina de afinidad a una columna de IMAC, de manera que al apelmazarse se redujera hasta un volumen final de 4 ml. A continuación, se equilibró la resina mediante un lavado con 30 ml del mismo tampón que se utilizó previamente para la extracción proteica. Una vez equilibrada, se añadió el extracto proteico a la columna y se incubó durante toda la noche a 4 °C, con un movimiento lento de oscilación.

A continuación, se efectuó la apertura de la columna, a fin de proceder a la separación del extracto. Posteriormente, se practicaron lavados consecutivos sin agitación, con 5 ml de TBS y concentraciones decrecientes de urea (6, 4, 2, 1 y 0,5 M), con el propósito de ir disminuyendo progresivamente la concentración de urea, mientras se permitía la renaturalización de las proteínas fijadas a la resina. Finalmente, se llevó a cabo un lavado en las mismas condiciones, con 60 ml de TBS, sin urea.

La elución de las proteínas retenidas en la resina se realizó mediante la adición del tampón de elución. Se practicaron 4 eluciones consecutivas con 4 ml de tampón, recogiendo cada una por separado. En cada elución, mediante SDS-PAGE, se confirmó la presencia de una banda purificada del tamaño predicho para cada proteína, y además se midió la concentración proteica utilizando un “NanoDrop 1000” (Thermo Scientific).

Para lavar y reutilizar la resina se llevó a cabo una elución con TBS con imidazol 500 mM y sucesivos lavados con un volumen total de 60 ml de TBS. La resina se recogió en TBS con un 33% de etanol y se almacenó a 4 °C para usos posteriores con la misma proteína.

3.7.1.10.4. Reconocimiento de las proteínas recombinantes por sueros procedentes de cerdos previamente expuestos a *Haemophilus parasuis*

Con el fin de comprobar si las proteínas recombinantes producidas eran reconocidas por anticuerpos de cerdos previamente infectados con la misma cepa, se llevaron a cabo ELISAs indirectos y *western blots*, enfrentando las proteínas recombinantes a suero procedente de:

- Cerdos previamente expuestos a *H. parasuis* mediante su vacunación con la bacterina comercial Porcilis® Glässer (Laboratorios Intervet), obtenida a partir de la cepa 4800 (mismo serotipo que la cepa Nagasaki) y, a continuación, infectados experimentalmente con la cepa Nagasaki, por vía intratraqueal.
- Cerdos no vacunados ni infectados previamente a *H. parasuis*.

La comparación entre grupos se realizó en dos momentos diferentes: cuando los cerdos infectados todavía no lo habían sido y cuando ya habían sido sometidos a la inmunización y posterior desafío. Además, para cada grupo también se efectuó la comparación entre estos dos momentos, antes y después del contacto con el microorganismo (en el caso del grupo expuesto). Los sueros utilizados en este ensayo se mantenían almacenados a -20 °C y procedían de una infección experimental anterior (Frاندoloso *et al.*, 2015a).

ELISA indirecto con sueros de cerdos previamente infectados con la bacteria y con sueros de cerdos no expuestos

En placas tapizadas con las proteínas recombinantes se llevaron a cabo ELISAs indirectos, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. El suero fue diluido 1/100 en PBS-Tween-20 con leche descremada al 5%. El anticuerpo secundario utilizado fue un anti IgG de cerdo, producido en conejo y conjugado con peroxidasa, que se diluyó 1/10.000 en PBS-Tween-20 con leche descremada al 5%. Se empleó suero de cuatro cerdos infectados y de otros cuatro animales control.

Western blots con sueros de cerdos previamente infectados con la bacteria y con sueros de cerdos no expuesto

Previamente se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida en las que se visualizaron en un mismo gel las tres proteínas recombinantes, en paralelo. Los geles resultantes fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, en las que se llevaron a cabo los *Western blots*, según el protocolo descrito anteriormente. Los sueros de los cerdos fueron diluidos 1/100 en TBS 1× con leche descremada al 5%, mientras que el anticuerpo secundario (anti IgG de cerdo, producida en conejo y conjugada con peroxidasa) fue diluido 1/10.000 en TBS 1× con leche descremada al 5%.

3.7.2. Valoración de la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes en conejos

Previamente a la valoración de la eficacia protectora frente a la enfermedad de Glässer en el cerdo, su hospedador natural, se llevó a cabo una prueba en un modelo de conejo, para comprobar la capacidad de las OMPs recombinantes de inducir la producción de anticuerpos específicos.

3.7.2.1. Descripción del modelo animal

Las pruebas se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario de la Universidad de León, siguiendo las directrices del Comité de Ética y del Real Decreto 53/2013. El informe favorable obtenido, ratificado posteriormente por la Junta de Castilla y León, como resulta preceptivo, se correspondió con la referencia ULE-006-2015.

Se utilizaron cuatro grupos de tres conejos de raza *New Zealand* (Charles River), de tres meses de edad, que fueron alojados en jaulas adecuadas y alimentados *ad libitum*. Tres de los grupos fueron utilizados para valorar cada una de las OMPs recombinantes por separado (un grupo para cada proteína), mediante tres inoculaciones por vía intramuscular espaciadas entre sí tres semanas. El cuarto grupo fue utilizado como control, siendo inoculado con un preparado idéntico al de los otros grupos, libre de proteínas.

Inmediatamente antes de cada inmunización y una semana después de la última, se llevaron a cabo extracciones de sangre a todos los animales para la obtención de suero, utilizando vacutainers sin aditivos (Becton Dickinson, 360910). Los sueros fueron utilizados para la realización de ELISAs indirectos en placas tapizadas con las proteínas recombinantes o con la bacteria entera (Figura 7).

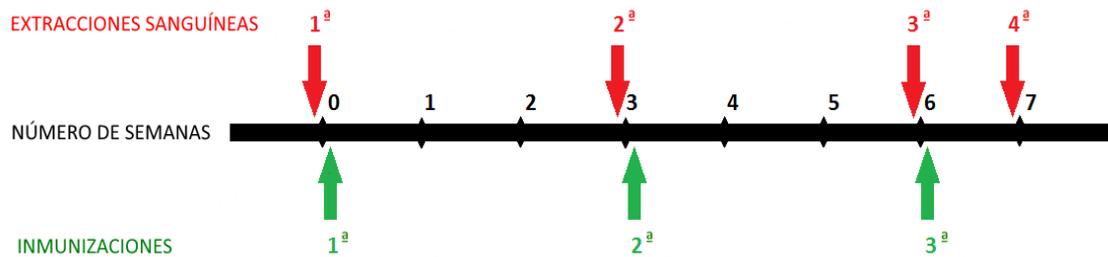


Figura 7: Cronograma por semanas de la prueba en conejos. Se indican las inmunizaciones y extracciones de sangre realizadas a los conejos.

3.7.2.2. Preparación de las dosis de antígeno

En cada inmunización se administró a todos los animales 1 ml de la emulsión por vía intramuscular, que fue preparada en una cabina de seguridad biológica, del siguiente modo:

- 50 μg de la proteína recombinante correspondiente purificada, diluidos en 200 μl de tampón acetato sódico estéril (0,1 M, pH 6). Previamente a la dilución, las proteínas fueron esterilizadas por filtración, a través de un poro de 0,2 μm .
- 800 μl de adyuvante Montanide IMS 2215 VG PR.

3.7.2.3. Obtención de los sueros

Las muestras de sangre se procesaron para la obtención de sueros mediante incubación durante 4 horas a 4°C y centrifugación posterior, durante 10 minutos a $3.220 \times g$. Los sueros se recogieron en tubos *ependorf* y fueron conservados en congelación a -20 °C hasta su utilización.

3.7.2.4. ELISAs indirectos con los sueros de los conejos

En placas tapizadas con proteínas recombinantes o con la bacteria inactivada se realizaron ELISAs indirectos, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. El suero fue diluido 1/100 en PBS-Tween-20 con leche descremada al 5%. El anticuerpo secundario utilizado fue anti IgG de conejos, producido en cabra y conjugado con peroxidasa, que se diluyó 1/10.000 en PBS-Tween-20 con leche descremada al 5%.

3.7.3. Valoración de la eficacia protectora de las proteínas recombinantes en el cerdo frente al desafío con la cepa Nagasaki de *Haemophilus parasuis*

Finalmente, se valoró la capacidad de las tres proteínas recombinantes en la posible inducción de protección frente a la enfermedad de Glässer en el cerdo, el hospedador natural de *H. parasuis*. Se llevó a cabo en cerdos mantenidos aislados, sin contacto previo con este microorganismo, que no habían recibido inmunidad pasiva de la madre en forma de calostro. La prueba consistió en la inmunización de los animales con las proteínas recombinantes y la posterior observación de su respuesta a un desafío provocado mediante la infección experimental con una dosis letal de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa Nagasaki de *H. parasuis* (cepa de referencia del serotipo 5, uno de los considerados más virulentos).

Al igual que en el caso anterior, antes del comienzo de la prueba se solicitaron a la Universidad de León los correspondientes permisos, de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, a través del Comité de Ética. El informe favorable obtenido, ratificado posteriormente por la Junta de Castilla y León, como resulta preceptivo, se correspondió con la referencia ULE-005-2015. En la página siguiente se presenta la concesión favorable, firmada por la entonces Secretaria del mencionado comité.

3.7.3.1. Obtención de calostro bovino

Para la alimentación de los lechones durante los primeros días de vida se utilizó calostro bovino puro o mezclado con harina, obtenido a partir de hembras sanas y en buenas condiciones de higiene, procedentes de granjas de vacuno localizadas en la provincia de León. Una vez recogido, se mantuvo congelado a -20°C . Posteriormente fue descongelado y pasteurizado en baño de agua a una temperatura de 62°C durante un mínimo de 30 minutos.



SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN
ANIMAL EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA (RD 53/2013)

Documento IIB: Informe del Subcomité para la Experimentación y Bienestar Animal (OEBA) de la Universidad de León

Dña. M^a José Díez Liébana, como Secretaria del Subcomité para la Experimentación y Bienestar Animal (OEBA) de la Universidad de León

CERTIFICA que:

El proyecto ULE_005_2015, titulado: Inmunización de cerdos privados de castrado con proteínas de superficie de *Haemophilus parasuis* presentado por D. César Bernardo Gutiérrez Martín ha recibido por parte del OEBA una **Evaluación favorable**.

Los miembros del OEBA para emitir el informe han verificado que el proyecto cumple con los requisitos exigidos en el artículo 34 del RD 53/2013:

- a) Está justificado desde el punto de vista científico o educativo, o debe realizarse por imposición legal o reglamentaria;
- b) Su finalidad justifica la utilización de animales; y
- c) Está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de la forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible.

Y para que conste y a los efectos oportunos firma el presente certificado en León a cinco de marzo de 2015



Imagen 3: Informa favorable para la prueba experimental en cerdos del Comité de Ética de la Universidad de León.

3.7.3.2. Obtención y cría de cerdos privados de calostro materno

Se obtuvieron 45 lechones Landrace × Duroc de una explotación de alto *status* sanitario, ubicada en la localidad zamorana de Villaveza del Agua. Se acudió a la explotación el día de inducción del parto y se recogieron los lechones directamente del canal del parto, evitando el contacto con la madre y con el ambiente de las instalaciones, especialmente con el suelo. Cada vez que se recogía un lechón se limpiaba su superficie corporal con etanol al 70 % para disminuir la carga microbiana. Inmediatamente después, los animales recién nacidos fueron trasladados a salas acondicionadas en el animalario de la Universidad de León y alojados en lechoneras. Al llegar al animalario, se les administró la primera ración de calostro bovino pasteurizado (a 62 °C durante 30 minutos), mediante biberón, y a las pocas horas se les inyectó por vía intramuscular 0,7 ml de hierro dextrano (Calidex-200, Calier) y 0,15 ml de gentamicina 6 % (Braun).

Durante los siguientes cinco días se alimentaron exclusivamente con calostro bovino pasteurizado (Imagen 4), repartido en cinco tomas diarias, frecuencia que se repitió diariamente. Posteriormente, se comenzó a introducir harina (Startrite 100 H, SCA Ibérica) en la ración, formando una papilla con el calostro bovino que se administraba inicialmente con biberón. Durante la semana siguiente se fue incrementando paulatinamente la cantidad de harina y sustituyendo el calostro por agua, además de abandonar la administración a través del biberón, puesto que se comenzó a colocar el alimento en platos situados en el suelo de las lechoneras (Imagen 5).

A los diez días, se comenzó a introducir gránulos de pienso medicado (NeutralSCA) y progresivamente se fue eliminando la harina de la ración hasta que la alimentación consistió exclusivamente en pienso granulado *ad libitum*.



Imagen 4: Administración de calostro bovino mediante biberón, durante los primeros días de vida.



Imagen 5: Alojamiento en lechoneras. Alimentación en comederos situados en el suelo de las lechoneras.

A los 16 días de vida se trasladaron los lechones a una granja experimental situada en Navafría (León) (Imagen 6), donde fueron mantenidos en los grupos experimentales descritos más adelante, monitorizando sus condiciones fisiológicas como temperatura, estado de salud e incremento de peso.

A los 21 días, se vacunaron frente a la infección por circovirus porcino tipo-2 con 2 ml de Porcilis-PCV (Intervet, A451A01) por vía intramuscular en las tablas de cuello. A los 40 días se comenzó a sustituir el pienso medicado por otro no medicado (Starter T-2 gránulo) que se mantuvo hasta el final del estudio. En la Figura 8 se describen las intervenciones principales durante el desarrollo de la prueba experimental.



Imagen 6: Alojamiento en las instalaciones de Navafría. Las condiciones de alojamiento favorecieron el bienestar de los animales, con paja seca, juguetes, agua de calidad y temperatura adecuada.

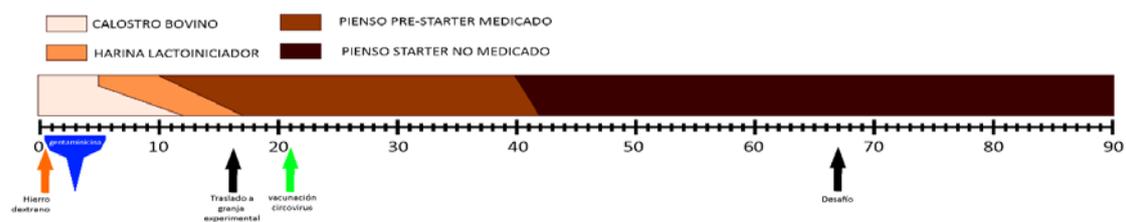


Figura 8: Cronograma en días de la cría de lechones privados de calostro materno. Se muestra la alimentación y principales hitos durante la cría.

3.7.3.3. Inmunización con proteínas recombinantes

3.7.3.3.1. Separación de los animales en grupos experimentales

Durante el proceso de cría fallecieron 11 lechones. Los 34 restantes fueron repartidos aleatoriamente en los siguientes grupos:

1. Animales no inmunizados ni desafiados (Control ND) (2 cerdos)
2. Animales no inmunizados, pero si desafiados (Control NI) (13 cerdos)
3. Animales inmunizados con la OmpP2 (4 cerdos)
4. Animales inmunizados con la OmP5 (4 cerdos)
5. Animales inmunizados con la OmpD15 (4 cerdos)
6. Animales inmunizados con una mezcla de las 3 proteínas recombinantes (4 cerdos)
7. Animales inmunizados con Porcilis® Glässer (Laboratorios Intervet), una bacterina comercial de la cepa 4800, perteneciente al serotipo 5 de *H. parasuis* (3 cerdos)

Todos los grupos, a excepción del primero, fueron desafiados posteriormente con *H. parasuis* (cepa Nagasaki).

3.7.3.3.2. Preparación de las dosis de antígenos vacunales

En el caso de los animales inmunizados con una sola de las proteínas recombinantes, cada dosis se correspondió con 2 ml de una emulsión preparada en una cabina de flujo laminar, según las siguientes proporciones:

- 1 mg de la proteína recombinante purificada correspondiente en 1 ml de tampón acetato sódico estéril (0,1 M, pH 6).
- 9 ml de adyuvante Montanide IMS 2215 VG PR.

En el caso de los animales inmunizados con las tres proteínas, la emulsión se preparó de acuerdo con la siguiente proporción:

- 1 mg de cada proteína recombinante purificada en 1 ml de tampón acetato sódico estéril (0,1 M, pH 6).
- 9 ml de adyuvante Montanide IMS 2215 VG PR.

A los animales de los grupos de proteínas se les administró en cada inmunización 2 ml de la emulsión correspondiente, de manera que la cantidad total de proteína

administrada a cada animal fue de 200 µg en los grupos inmunizados con una sola proteína, o de 600 µg en el grupo inmunizado con las tres proteínas (200 µg de cada una). A los animales de los grupos control no inmunizados (ND y NI) se les inoculó una emulsión preparada siguiendo la misma proporción anterior, a base de Montanide y tampón acetato, pero sin contener ninguna proteína recombinante. Al grupo de animales inmunizados con Porcilis® Glässer se le administró en cada dosis 2 ml del preparado comercial.

3.7.3.3.3. Pauta de inmunización

En cada uno de los grupos se llevaron a cabo dos inmunizaciones: la primera se administró a los 29 días de vida y la segunda, a los 50 días. El volumen fue de 2 ml por vía intramuscular, repartido 1 ml en cada muslo. Previamente a cada inmunización, se extrajo sangre a todos los animales, que fue recogida en vacutainers con EDTA (Becton Dickinson, 5301521), para la extracción posterior de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), o en vacutainers sin aditivo alguno (Becton Dickinson, 360910), para la obtención de suero.

3.7.3.4. Infección experimental

Se realizó cuando los animales tenían 67 días de vida, mediante la inyección por vía intratraqueal (desafío) con una dosis letal de aproximadamente 10^8 UFC de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*.

3.7.3.4.1 Curvas de crecimiento de *Haemophilus parasuis*

Sobre la base de estudios anteriores se seleccionó una dosis letal de la cepa Nagasaki, cepa de referencia del serotipo 5, consistente en 10^8 UFC. Con anterioridad a la infección experimental, se realizaron curvas de crecimiento con el microorganismo con el fin de establecer una relación entre la densidad óptica a 600 nm y la concentración bacteriana en UFC/ml. Partiendo de un cultivo líquido en fase exponencial en caldo PPLO, enriquecido con glucosa y NAD, se realizaron mediciones periódicas de la densidad óptica a 600 nm a partir de alícuotas de ensayo, a la vez que se procedía a realizar diluciones seriadas en solución salina estéril, seguidas de siembras en agar chocolate para efectuar su recuento.

El reactivo seleccionado para resuspender los microorganismos en el inóculo infectivo fue RPMI-1640 que, como es conocido, mantiene la supervivencia microbiana en sus valores iniciales, sin facilitar su multiplicación, por lo que la suspensión se mantiene estabilizada. Por ello, una vez establecida la relación entre la densidad óptica en el caldo PPLO y las UFC/ml, se comprobó si se mantenía al realizar una resuspensión a la misma densidad óptica en RPMI-1640. A tal fin, se llevó a cabo el cultivo de la bacteria en caldo PPLO hasta la densidad óptica adecuada, centrifugando el cultivo a $1.150\times g$ durante 15 minutos y resuspendiendo el sedimento en RPMI-1640 hasta la misma densidad óptica, para efectuar después las diluciones seriadas correspondientes en solución salina estéril y llevar a cabo las siembras para el recuento.

3.7.3.4.2. Preparación del inóculo para el desafío

Se realizó inmediatamente antes de la infección. Partiendo de un cultivo en caldo PPLO enriquecido con NAD y glucosa, con una densidad óptica adecuada, se centrifugó a $1.150\times g$ durante 15 minutos y se resuspendió el sedimento en RPMI-1640 para obtener una concentración final de bacterias de 10^8 UFC/ml. Esta resuspensión fue diluida al 50% en RPMI-1640 y se prepararon dosis individuales de 2 ml en jeringas estériles, de manera que el número total de bacterias en cada dosis fue de 10^8 UFC, en un volumen final de 2 ml.

A partir de la resuspensión bacteriana se prepararon diluciones seriadas y se llevaron a cabo siembras en placas de agar chocolate para confirmar la dosis inoculada, tanto en el momento de la preparación del inóculo como después de la finalización del desafío. Las dosis se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su inoculación a los animales.

3.7.3.4.3. Desafío

Como se ha señalado, se llevó a cabo a los 67 días, inoculando la suspensión de bacterias a todos los cerdos, con excepción del grupo control de animales no desafiados ni vacunados. Previamente al procedimiento, los cerdos fueron sedados mediante inyección intramuscular de una mezcla de ketamina y azaperona (0,8 ml de Imalgene 100 mg/ml + 2 ml de Stressnil® 40 mg/ml) con el fin de evitar cualquier tipo de sufrimiento.

Con el desafío experimental, a cada cerdo se le inocularon 2 ml de RPMI-1640 con 10^8 UFC de *H. parasuis*. La inoculación se realizó por vía intratraqueal, mediante punción debajo del cricoides con una aguja de 18 G (Imagen 7). Los animales se colocaron unos segundos con su eje longitudinal en vertical y se les aplicó un masaje pulmonar para asegurar que el inóculo accediese a los pulmones. Inmediatamente antes del desafío se extrajo sangre de todos los animales, utilizando vacutainers con EDTA para obtención de PBMCs y otros sin aditivos para la recogida de suero.



Imagen 7: Inoculación intratraqueal de la dosis de desafío (10^8 UFC).

3.7.3.4.4. Curso de la infección

Posteriormente al desafío, los animales fueron monitorizados mediante mediciones periódicas de su temperatura rectal y anotaciones de los signos clínicos observados. Además, se extrajo sangre para la obtención de PBMCs y suero, 24 horas después del desafío, cuando la sintomatología resultaba evidente. En caso de observarse signos de sufrimiento animal, los cerdos fueron eutanasiados humanitariamente mediante una inyección intravenosa o intracardíaca con T-61® (Intervet), previa sedación profunda con ketamina y azaperona. Los animales supervivientes se eutanasiaron siguiendo la misma metodología a los 14 días del desafío (Figura 9).

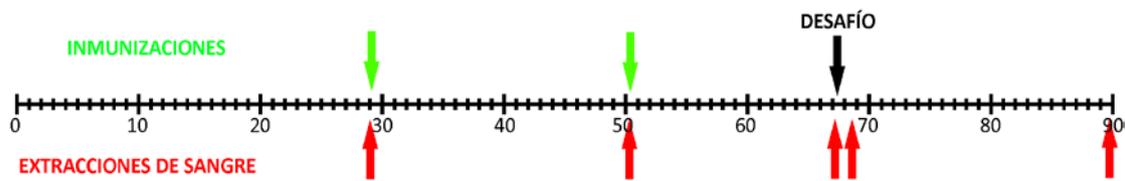


Figura 9: Cronograma de las inmunizaciones, extracciones de sangre y desafío en cerdos.

3.7.3.4.5. Necropsia y toma de muestras

Después de la muerte de los animales, se procedió a practicar su necropsia, para la recogida de muestras y el estudio de las lesiones. Con este fin, los cadáveres fueron trasladados desde la granja experimental hasta la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, en el menor tiempo posible después de la muerte y en condiciones adecuadas, con dispositivos de mantenimiento de frío, a una temperatura de 4°C o inferior. Ya en la sala, se procedió a la apertura de las cavidades craneal, torácica y abdominal, así como de las articulaciones del carpo y del tarso. Se describieron las lesiones anatomopatológicas, mientras se procedía a la toma de muestras.

Toma de muestras para aislamiento de *Haemophilus parasuis*

Para el aislamiento microbiano se tomaron muestras mediante hisopo directamente en el espacio subaracnoideo a nivel de cerebro, en las cavidades pericárdica y peritoneal, en los parénquimas hepático, esplénico y pulmonar, y en las articulaciones del carpo y tarso. Los hisopos se utilizaron después para realizar siembras en placas de agar chocolate para el posterior aislamiento de los microorganismos presentes.

Toma de muestras para estudio de lesiones microscópicas

Se recogieron muestras de cerebro, pulmón, hígado y bazo y se conservaron en formaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, HT501640) para el estudio histopatológico posterior llevado a cabo por la empresa Micros Veterinaria.

Toma de muestras para extracción de ARN

Se tomaron muestras de pulmón, hígado, bazo y de los ganglios traqueobronquiales. Rápidamente fueron colocadas en tubos con la solución estabilizadora RNAlater (Ambion). Los tubos se mantuvieron toda la noche a 4 °C y, transcurrido ese tiempo, se retiró la solución y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

3.7.3.4.6. Aislamiento de *Haemophilus parasuis*

Como se ha indicado, los hisopos procedentes de las necropsias se sembraron en placas de agar chocolate, incubando durante 24 horas a 37 °C y una atmósfera con un 5% de CO₂. Las colonias aisladas con una morfología compatible con la de *H. parasuis* se subcultivaron en agar chocolate durante otras 24 horas. Por último, se extrajo el ADN y se realizó una PCR para confirmar la presencia o ausencia de *H. parasuis* en los aislados. Se utilizó una PCR de amplificación del gen codificante del ARN 16S (Oliveira *et al.*, 2001), utilizando la mezcla maestra indicada en la Tabla 13.

REACTIVO	VOLUMEN
Agua libre de ADNasas	38,75 µl
Tampón de la <i>Taq</i> polimerasa	5 µl
Cebador HPSFW	1 µl
Cebador HPSRV	1 µl
Desoxinucleótidos	1 µl
<i>Biotools DNA Polymerase</i> (5 U/µl)	0,25 µl
Muestra de ADN	3 µl

Tabla 13: Mezcla maestra de la PCR convencional para amplificar el gen 16S de *H. parasuis*. Los volúmenes de reactivos están referidos para una sola reacción de amplificación con un volumen final de 50 µl.

El programa del termociclador incluía una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación. En la fase de desnaturalización de los ciclos se utilizó una temperatura de 94°C durante 30 segundos. En el anillamiento de los ciclos, se aplicó durante 3 minutos una temperatura de 63°C y en la elongación se utilizó una temperatura de 72°C durante 2 minutos. Después de finalizar los ciclos, se efectuó un paso de elongación final de 10 minutos a 72°C. A continuación, se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% la presencia de la banda de la longitud esperada.

3.7.3.5. Estudios serológicos

Los sueros obtenidos fueron utilizados para realizar ELISAs indirectos frente a los antígenos representados por las proteínas recombinantes y frente a las bacterias completas inactivadas.

3.7.3.5.1. Obtención de sueros

Al igual que se explicó en el apartado del estudio en conejos, las muestras de sangre se mantuvieron durante 4 horas a 4°C y seguidamente se centrifugaron durante 10 minutos a 3.220× g. Los sueros se conservaron por congelación a -20°C hasta su utilización.

3.7.3.5.2. ELISAs indirectos con los sueros de cerdos procedentes de la prueba experimental

En placas tapizadas con las proteínas recombinantes o con las bacterias enteras inactivadas se realizaron ELISAs indirectos, según el protocolo anteriormente descrito. El suero fue diluido 1/100 en PBS-Tween-20 con leche descremada al 5%. El anticuerpo secundario utilizado fue un anti IgG de cerdo, producido en conejo y conjugado con peroxidasa, que se diluyó 1/10.000 en PBS-Tween-20 con leche descremada al 5%.

3.7.3.6. Estudio de genes relacionados con la respuesta inmunitaria mediante PCR en tiempo real

3.7.3.6.1. Extracción y conservación del ARN

Las muestras de órganos mantenidas en congelación a -80°C fueron utilizadas para la extracción del ARN mediante el *kit* “RNeasy® Plus Mini”, según las especificaciones del fabricante. Las concentraciones y pureza del ARN de cada muestra se midieron utilizando un “NanoDrop 1000” (Thermo Scientific), de tal forma que se consideraron válidas aquellas cuya concentración resultó superior a 50 ng/μl, con una *ratio* 260/280 de alrededor de 2 y una *ratio* 260/230 por encima de 2. Además, se valoró la integridad del ARN mediante geles de agarosa, buscando la presencia de las dos bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S. Las muestras se conservaron por congelación a -80 °C.

3.7.3.6.2. Eliminación del ADN genómico y síntesis del ADN complementario (ADNc)

Tanto la eliminación del ADN genómico como la retrotranscripción para sintetizar ADNc se llevaron a cabo mediante dos reacciones secuenciales, utilizando el “QuantiTect® Reverse Transcription Kit”, según las especificaciones del fabricante. En total, se retrotranscribieron 500 ng de ARN de cada muestra. Las muestras de ADNc fueron diluidas 1/4 en agua libre de nucleasas y conservadas por congelación a -20 °C.

3.7.3.6.3. Genes investigados

Se estudió la expresión relativa de los genes que codifican los receptores TLR-2, TLR-4, CD163, CD14, de las interleucinas 1, 6 y 8 (IL1, IL6 e IL8), de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1 o CCL2) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). Como gen constitutivo se utilizó el gen codificante de la ciclofilina. Los cebadores específicos de cada gen se muestran en la Tabla 7.

3.7.3.6.4. Protocolo de la PCR en tiempo real

Para la realización de las PCRs en tiempo real se utilizó la mezcla maestra indicada en la Tabla 14.

REACTIVO	VOLUMEN
Agua libre de ADNAsas	5,7 μ l
SG qPCR Master Mix 2 \times	7,5 μ l
Cebador <i>forward</i>	0,3 μ l
Cebador <i>reverse</i>	0,3 μ l
Muestra de ADNc	1,2 μ l

Tabla 14: Mezcla maestra de PCR en tiempo real. Los volúmenes se refieren a una única reacción de amplificación, con un volumen final de 15 μ l. El reactivo “SG qPCR Master Mix 2 \times ” contiene la DNA polimerasa, desoxinucleótidos, SYBR Green y tampón de reacción

Cada reacción sobre una muestra se ejecutó por duplicado, utilizando además para cada pareja de cebadores una curva patrón con diluciones decimales seriadas de una muestra patrón. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador modelo “Mastercycler[®] ep realplex²” (Eppendorf). El programa constó de una fase de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación. En el paso de desnaturalización, se empleó una temperatura de 94 °C durante 30 segundos y en el paso de anillamiento, se aplicó durante 30 segundos una temperatura de 63 °C. En el paso de elongación se recurrió a una temperatura de 72 °C durante 45 segundos, momento en el que se realizó la medición de la fluorescencia. Los ciclos fueron seguidos de una curva de fusión (*melting*) consistente en aplicar al comienzo 95 °C durante 30 segundos, luego 57 °C durante 20 segundos y, por último, ir incrementando progresivamente la temperatura durante 20 minutos hasta alcanzar los 95 °C, este último incremento fue acompañado de mediciones periódicas de fluorescencia.

3.7.3.6.5. Análisis de datos

El seguimiento y visualización de los resultados se realizó utilizando el programa propio del termociclador (“Realplex Software V2.2”) y los datos se analizaron mediante el método “ $\Delta\Delta C_t$ ”, normalizando los valores con el gen constitutivo y el grupo control.

3.8. ESTUDIO DE RECEPTORES RELACIONADOS CON LA SEPSIS SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN CERDOS INFECTADOS CON *Haemophilus parasuis*

Mediante citometría de flujo se estudió la influencia de un proceso septicémico en la intensidad de la expresión en superficie de diferentes marcadores relacionados con la respuesta inmunitaria innata. Sobre los monocitos se estudiaron las modificaciones en los receptores TLR-2, TLR-4, CD163, Siglec-1, Siglec3 y Siglec5, mientras que, en el caso de linfocitos, se estudió el receptor Siglec-10. Para cada marcador, se compararon los niveles de expresión en diferentes animales en el instante inmediatamente anterior al desafío, con los niveles de expresión en un momento en que la sintomatología del proceso séptico resultaba evidente. Se utilizaron 10 animales control no inmunizados pero sí desafiados procedentes de la infección experimental.

3.8.1. Aislamiento y conservación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Para cada muestra se partió de 10 ml de sangre extraída en vacutainers con EDTA, que se diluyeron en 20 ml de la solución de lavado (DPBS + SFB). El volumen total de la dilución anterior se repartió entre cuatro tubos de 15 ml con 4 ml de “Histopaque®-1077”, aproximadamente a razón de 7,5 ml de sangre diluida por tubo. Los tubos se centrifugaron a $650\times g$, durante 35 minutos, sin freno. Con una pipeta *Pasteur* se recogieron los PBMCs de la interfase de cada uno de los tubos y se transfirieron a un único tubo limpio. Los PBMCs se lavaron mediante su resuspensión en 10 ml de la solución de lavado, antes de su centrifugación a $450\times g$ durante 10 minutos, para luego retirar todo el sobrenadante con una pipeta *Pasteur* y una bomba de vacío. Se repitió el proceso de lavado y, al finalizar, se resuspendieron los PBMCs en 1 ml de medio de congelación (SFB + DMSO) y se pasaron a un criovial.

Las muestras se conservaron congeladas en nitrógeno líquido. Para disminuir la mortalidad durante el proceso de congelación, se utilizaron camisas rellenas de alcohol isoamílico. Los viales de congelación fueron introducidos en ellas y luego éstas se colocaron en un congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Posteriormente, los viales se trasladaron a un tanque con nitrógeno líquido para su preservación a largo plazo.

3.8.2. Descongelación de PBMCs

Para evitar los efectos tóxicos del DMSO era necesario que la descongelación ocurriera lo más rápidamente posible, de manera que se pudiera eliminar cuanto antes dicho reactivo. Con este propósito, en cuanto se extraía un vial del tanque de nitrógeno líquido, se introducía en un vaso con agua a 37 ° C. Una vez descongelado, se recogía todo el volumen y se transfería a un tubo de 15 ml con 14 ml de tampón FACs, de manera que se diluyera el DMSO. A continuación, se centrifugaba el tubo durante 8 minutos a $340\times g$ y 4 °C. Se eliminaba todo el sobrenadante y se resuspendía el sedimento en un volumen apropiado de tampón FACs. El procedimiento descrito se aplicó para descongelar cada vial de PBMCs y, acto seguido, se mantuvo en hielo hasta el inicio del marcaje.

3.8.3. Recuento de PBMCs

De cada suspensión de PBMCs descongelados en FACs se tomaron 10 μ l y se diluyeron en 90 μ l de solución azul de tripán 1 \times . Dicha suspensión se observó en una cámara Neubauer con la dilución anterior y se llevó a cabo el recuento del número total de PBMCs, así como del número de células vivas y células muertas. De esta manera, se calculó la concentración de PBMCs totales/ml de la suspensión en FACs y el porcentaje de mortalidad. En función de la concentración obtenida después del recuento, se diluyeron las muestras para ajustar a la concentración necesaria, con el fin de realizar los marcajes de la citometría de flujo.

3.8.4. Dobles marcajes

Los marcajes se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo en “V” (Greiner bio-one, 651101). Los marcajes sobre muestras procedentes del mismo animal (antes y después del desafío) se efectuaron siempre de forma simultánea, añadiendo el mismo número de células a los pocillos correspondientes.

Para realizar los controles negativos de cada marcaje, se utilizaron anticuerpos irrelevantes del mismo isotipo que los anticuerpos específicos del marcador que se deseaba estudiar. De esta forma, para cada marcaje doble realizado sobre una sola muestra se utilizaron los siguientes tubos:

- 1- **Doble negativo:** Ac irrelevante (isotipo A) + Ac irrelevante (isotipo B)
- 2- **Negativo para isotipo B:** Ac específico (isotipo A) + Ac irrelevante (isotipo B)
- 3- **Negativo para isotipo A:** Ac irrelevante (isotipo A) + Ac específico (isotipo B)
- 4- **Doble positivo:** Ac específico (isotipo A) + Ac específico (isotipo B)

* Ac = anticuerpo

Además, para cada muestra también se incluyó un tubo con PBMCs sin ningún tipo de marcaje.

3.8.4.1. Procedimiento de los dobles marcajes

En función de la concentración de PBMCs/ml, se añadió el volumen necesario a cada pocillo para obtener un número de PBMCs entre 400.000 y 1.000.000 células. Se centrifugaron las placas durante 4 minutos a $340\times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, eliminando posteriormente el sobrenadante. Se añadieron a los pocillos 50 μl de cada anticuerpo primario correspondiente (volumen final por pocillo de 100 μl), se resuspendieron los sedimentos y se llevó a cabo una incubación en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 100 μl de tampón FACs, se centrifugaron las placas durante 4 minutos a $340\times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados de los sedimentos, consistentes en añadir a cada pocillo 200 μl de tampón FACs, resuspender el sedimento, centrifugar durante 4 minutos a $340\times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y eliminar el sobrenadante. A continuación, se añadió a los pocillos 50 μl de cada anticuerpo conjugado comercial, convenientemente diluido en tampón FACs con un 5 % de suero de cerdo (volumen final

por pocillo de 100 µl), se resuspendieron los sedimentos y se colocaron las placas a incubar en hielo y oscuridad durante 30 minutos. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 100 µl de tampón FACs para después centrifugar durante 4 minutos a 340× g y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se practicaron dos lavados con tampón FACs, idénticos a los realizados tras la incubación con el anticuerpo primario. Por último, se recogieron los sedimentos de cada pocillo con 200 µl de tampón FACs-fijador y se trasladaron a tubos de citómetro (BD Falcon™ 352052), en los que previamente se habían añadido 300 µl de tampón FACs fijador (volumen final por tubo de 500 µl). Los tubos se mantuvieron en oscuridad y 4 °C hasta su estudio en el citómetro de flujo.

3.8.4.2. Dobles marcajes realizados

3.8.4.2.1. Dobles marcajes con anti-CD172a

Como primera aproximación, se realizaron marcajes dobles enfrentando CD172a con los receptores TLR-2, TLR-4, Siglec-1, Siglec-3, Siglec-5, Siglec-10 y CD163. Se midieron las intensidades de expresión antes del desafío en tres animales y se compararon con las intensidades después del desafío en los mismos animales (Tabla 15).

COMBINACION DE ANTICUERPOS PRIMARIOS	COMBINACIÓN DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ANIMALES
αCD172a-IgG2b (74-22-15) / αTLR2-IgG1 (1H11)	GAM-IgG2b-APC (1/3000) / RAM-αIgG1 -Fitc (1/1000)	3 + 3
αCD172a-IgG2b (74-22-15) / αTLR4-IgM (3H3)	GAM-αIgG2b-APC (1/3000) / GAM-αIgM-Fitc (1/200)	3 + 3
αCD172a-IgG2b (74-22-15) / αSIGLEC1-IgG2a (1F1/CR4)	GAM-αIgG2b-APC (1/3000) / GAM-αIgG2a-Fitc (1/200)	3 + 3
αCD172a-IgG2b (74-22-15) / αSIGLEC3-IgG1 (5D5)	GAM-IgG2b-APC (1/3000) / RAM-αIgG1 -Fitc (1/1000)	3 + 3
αCD172a-IgG2b (74-22-15) / αSIGLEC5-IgG1 (4F7)	GAM-IgG2b-APC (1/3000) / RAM-αIgG1 -Fitc (1/1000)	3 + 3
αCD172a-IgG2b (74-22-15) / αSIGLEC10-IgG1 (2E9)	GAM-IgG2b-APC (1/3000) / RAM-αIgG1 -Fitc (1/1000)	3 + 3
αCD172a-IgG2b (74-22-15) / αCD163-IgG2a (1C6/BM)	GAM-αIgG2b-APC (1/3000) / GAM-αIgG2a-Fitc (1/200)	3 + 3

Tabla 15: Dobles marcajes realizados con anti-CD172a. En la columna de los anticuerpos primarios se indica entre paréntesis el nombre del clon productor del sobrenadante. Los irrelevantes utilizados fueron el clon 3E4 para el isotipo IgG2b, el clon 4B9 para el isotipo IgG1, el clon 1D9 para el isotipo IgG2a y el clon comercial 7E10 para el isotipo IgM. Todos los sobrenadantes se utilizaron sin diluir excepto el 7E10, que se empleó a una dilución final en pocillo de 1/100. En la columna de los anticuerpos secundarios se indica entre paréntesis la dilución final en pocillo con la que se trabajó. El RAM-αIgG1-Fitc utilizado en este doble marcaje procedió de BD-Pharmigen.

3.8.4.2.2. Dobles marcajes con 6D10

Para asegurarse que lo observado en el marcaje anterior no se debía a variaciones en la cantidad de granulocitos contaminantes en las muestras, se valoró la expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, Siglec-3, Siglec-5 y CD163 en un doble marcaje en el que se cruzaron con un anticuerpo específico de granulocitos (6D10) y se estudiaron los cambios de expresión en células 6D10 negativas (Tabla 16).

COMBINACION DE ANTICUERPOS PRIMARIOS	COMBINACIÓN DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ANIMALES
α PMN-IgG2a (6D10) / α TLR2-IgG1 (1H11)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / RAM- α IgG1 -Fitc (1/100)	3 + 3
α PMN-IgG2a (6D10) / α TLR4-IgM (3H3)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / GAM- α IgM-Fitc (1/200)	3 + 3
α PMN-IgG2a (6D10) / α CD163-IgG1 (2A10/11)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / RAM- α IgG1 -Fitc (1/100)	3 + 3
α PMN-IgG2a (6D10) / α SIGLEC3-IgG1 (5D5)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / RAM- α IgG1 -Fitc (1/100)	3 + 3
α PMN-IgG2a (6D10) / α SIGLEC5-IgG1 (4F7)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / RAM- α IgG1 -Fitc (1/100)	3 + 3

Tabla 16: Dobles marcajes realizados con el anticuerpo monoclonal 6D10. En la columna de los anticuerpos primarios se indica entre paréntesis el nombre del clon productor del sobrenadante. Los irrelevantes utilizados fueron el clon 4B9 para el isotipo IgG1, el clon 1D9 para el isotipo IgG2a y el clon comercial 7E10 para el isotipo IgM. Todos los sobrenadantes se utilizaron sin diluir, excepto el 7E10, que se empleó a una dilución final en pocillo de 1/100, y el 2A10/11 (α CD163-IgG1) que se empleó a una dilución final de 1/50. En la columna de los anticuerpos secundarios se indica entre paréntesis la dilución final en pocillo con la que se trabajó. El RAM- α IgG1-Fitc utilizado en este doble marcaje procedió de Southern Biotech.

3.8.4.2.3. Dobles marcajes con anti-CD163

Paralelamente al marcaje anterior se llevó a cabo otra serie de marcajes dobles enfrentando CD163 a cada uno de los receptores TLR-2, TLR-4, Siglec-1, Siglec-3 y Siglc-5, lo que permitió estudiar la variación de expresión de estos marcadores en CD163 positivos y negativos. Al igual que antes, se estudiaron las diferencias en la intensidad de la expresión entre antes y después del desafío para un mismo animal. Esta medición se realizó en un número variable de animales, pudiendo ser 5 ó 6, dependiendo de la combinación (Tabla 17).

COMBINACION DE ANTICUERPOS PRIMARIOS	COMBINACIÓN DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ANIMALES
α CD163-IgG2a (1C6/BM) / α TLR2-IgG1 (1H11)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / RAM- α IgG1 -Fitc (1/100)	6 + 6
α CD163-IgG2a (1C6/BM) / α TLR4-IgM (3H3)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / GAM- α IgM-Fitc (1/200)	6 + 6
α SIGLEC1-IgG2a (1F1/CR4) / α CD163-IgG1 (2A10/11)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / RAM- α IgG1 -Fitc (1/100)	5 + 5
α CD163-IgG2a (1C6/BM) / α SIGLEC3-IgG1 (5D5)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / RAM- α IgG1 -Fitc (1/100)	6 + 6
α CD163-IgG2a (1C6/BM) / α SIGLEC5-IgG1 (4F7)	GAM-IgG2a-APC (1/400) / RAM- α IgG1 -Fitc (1/100)	6 + 6

Tabla 17: Dobles marcajes realizados con anti-CD163. En la columna de los anticuerpos primarios se indica entre paréntesis el nombre del clon productor del sobrenadante. Los irrelevantes utilizados fueron el clon 4B9 para el isotipo IgG1, el clon 1D9 para el isotipo IgG2a y el clon comercial 7E10 para el isotipo IgM. Todos los sobrenadantes se utilizaron sin diluir, excepto el 7E10, que se empleó a una dilución final en pocillo de 1/100, y el 2A10/11 (α CD163-IgG1) que se empleó a una dilución final de 1/50. En la columna de los anticuerpos secundarios se indica entre paréntesis la dilución final en pocillo con la que se trabajó. El RAM- α IgG1-Fitc utilizado en este doble marcaje procedió de Southern Biotech.

3.8.5. Citómetros utilizados y análisis de datos

Los marcajes dobles con CD172a se realizaron en un citómetro “FACSCanto II” (BD Bioscience), del grupo de Inmunología Porcina del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), en Madrid. Los marcajes dobles con 6D10 y CD163 se realizaron en un citómetro “MACSQuant[®] Analyzer 10” (Miltenyi Biotec), del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Los análisis de los datos se realizaron por medio del programa Flowjo[®] V10. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student para muestras relacionadas utilizando el programa SPSS (IBM).

3.9. BÚSQUEDA MEDIANTE ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS DE PROTEÍNAS SOBREENPRESADAS EN LA SUPERFICIE DE *Haemophilus parasuis* EN CONDICIONES DE CULTIVO MIMÉTICAS A LA INFECCIÓN

El objetivo de esta prueba fue estudiar mediante *RNA-Seq* las modificaciones que se producen en el transcriptoma de *H. parasuis* cuando se cultiva en condiciones de restricción de hierro y temperatura elevada, es decir, condiciones aproximadamente similares a las del ambiente en el hospedador durante la infección, en comparación con su cultivo en condiciones óptimas de crecimiento. El análisis se enfocó hacia los genes sobreexpresado codificantes de proteínas de membrana externa o extracelulares, que pudiesen tener valor desde un punto inmunológico. Para ello, se extrajo ARN de dos cultivos de la bacteria en las siguientes condiciones:

- Caldo PPLO suplementado con glucosa y NAD, a 37 °C (condición control)
- Caldo PPLO suplementado con glucosa, NAD y el quelante de hierro 2,2'-dipiridilo, a 41 °C (condiciones miméticas a las de la infección)

De cada una de las condiciones se efectuaron tres réplicas, de modo que se comparó el transcriptoma de un grupo de tres muestras en condiciones control con otro grupo de otras tres en condiciones miméticas.

3.9.1. Curvas de crecimiento de *Haemophilus parasuis*

Como se esperaba que el crecimiento a temperatura elevada y condiciones restrictivas de hierro no adoptara la misma cinética que en las condiciones óptimas de cultivo, se optó por realizar curvas de crecimiento para establecer los valores de densidad óptica entre los que se encontraba la fase exponencial. Estas curvas se realizaron en:

- Condiciones óptimas de cultivo (37 °C, sin dipiridilo)
- Condiciones restrictivas de hierro (37 °C, con dipiridilo)
- Condiciones miméticas en relación a la infección (41 °C, con dipiridilo)

3.9.1.1. Procedimiento de elaboración de las curvas

Partiendo de un cultivo de una noche (aproximadamente 18 horas de incubación) se inocularon 100 ml de caldo PPLO suplementado con NAD y glucosa y se dispusieron a crecer a 37 °C ó 41 °C. Al alcanzar una densidad óptica a 600 nm en torno a un valor de 0,3 se añadieron, cuando procedía, 200 µl de la solución stock de 2,2'-dipiridilo 50 mM, para obtener una concentración final en el medio de 100 µM. A partir de ese momento, se realizaron mediciones de densidad óptica y diluciones seriadas periódicamente, seguidas de la siembra en placas de agar chocolate para calcular las UFC/ml correspondientes.

3.9.2. Obtención de las muestras de ARN

3.9.2.1. Extracción de ARN

Una vez establecidas las densidades ópticas adecuadas para que los cultivos se encontraran en fase exponencial, se cultivaron 30 ml de caldo con las condiciones control o miméticas, según el caso. Cuando se alcanzó la densidad óptica adecuada, se centrifugó el cultivo durante 7 minutos a 7.000× g y 4 °C, y se eliminaron los sobrenadantes para rápidamente colocar los sedimentos en hielo. Sobre estos últimos se realizó la extracción de ARN, utilizando el *kit* “High Pure RNA Isolation”, según las especificaciones del fabricante. Por último, se midieron las concentraciones de ARN utilizando un “NanoDrop 1000” (Thermo Scientific). Se consideraron válidas aquellas muestras cuya concentración resultó superior a 50 ng/µl, su *ratio* 260/280 en torno a 2 y su *ratio* 260/230 por encima de 2.

3.9.2.2. Eliminación del ADN contaminante

Para eliminar el ADN contaminante se utilizó el *kit* “DNA-free™”, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante, con algunas modificaciones que se describen a continuación. Las muestras de ARN se diluyeron en agua libre de nucleasas hasta una concentración de 10 µg de ARN en 44 µl de volumen, añadiendo después a la dilución 5 µl de tampón 10× y 1 µl de DNAsa e incubando 60 minutos en un baño a 37 °C. A continuación, se volvió a añadir 1 µl de DNAsa y se incubó de nuevo 60 minutos a 37 °C en un baño de agua. La reacción se detuvo por medio de la incorporación

de 10 µl de tampón de inactivación e incubando posteriormente 5 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar 2 minutos a 16.000× g en una microcentrífuga 5415 R (Eppendorf), se recogió el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Para verificar que se eliminaba el ADN de las muestras, se realizó una PCR como la descrita en el apartado de aislamiento de *H. parasuis*. Las muestras se conservaron mediante congelación a -80 °C.

3.9.2.3. Comprobación de la integridad del ARN

Se realizó utilizando un “Bioanalyzer Agilent 2100” (Agilent Technologies), del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León.

3.9.3. Preparación de la librería de ADNc, secuenciación y análisis bioinformático de expresión diferencial

La producción de la librería de ADNc, secuenciación y análisis bioinformático fue realizada por la empresa ERA7 Bioinformatics (Granada, España).

3.9.3.1. Eliminación del ARN ribosómico (ARNr)

Se utilizó el “Ribo-Zero rRNA magnetic Kit Bacteria” (Illumina).

3.9.3.2. Preparación de la librería de ADNc

Las librerías de ADNc se prepararon utilizando el *Kit* “NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep kit for Illumina” (New England Biolabs), según las instrucciones del fabricante. Las librerías obtenidas fueron validadas y cuantificadas utilizando un “Agilent 2100 Bioanalyzer” y el “DNA7500 LabChip kit”.

3.9.3.3. Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el “NextSeq™ 500 High Output Kit” en un secuenciador “NextSeq500”, con una profundidad de 10 M.

3.9.3.4. Análisis bioinformático de expresión diferencial

Para el análisis bioinformático en búsqueda de genes expresados de forma diferencial se empleó TopHat y el paquete Cufflinks (Ghosh & Chan, 2016), aplicando los siguientes pasos (Figura 10):

- Control de calidad de las lecturas brutas con la herramienta FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).
- Alineamiento con el genoma de referencia, utilizando la herramienta TopHat (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>). Al no encontrarse secuenciado completamente el genoma de la cepa Nagasaki, se utilizó como genoma de referencia el de la cepa SH0165 (número de acceso en el Genbank NC_011852.1), que pertenece asimismo al serotipo 5.
- Ensamblado de transcritos con la herramienta Cufflinks y fusión de transcritos con Cuffmerge (del paquete Cufflinks).
- Análisis de genes expresados diferencialmente con la herramienta Cuffdiff (del paquete Cufflinks). Se consideraron estadísticamente significativos aquellos casos que presentasen un p valor inferior a 0,05, corregido mediante la corrección de Benjamini-Hochberg. Para posteriores análisis solo se tuvieron en cuenta aquellos genes cuyos \log_2 (*fold change*) fuese superior a 10.

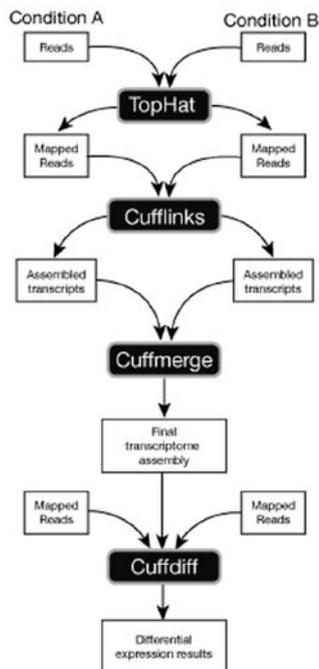


Figura 10: Flujo de trabajo en el análisis de expresión diferencial de genes.

3.9.4. Estudios sobre los genes expresados de forma diferencial

Los genes diferencialmente expresados fueron sometidos a:

- Búsqueda de las proteínas codificadas por ellos en la base de datos del “Genbank” y “Uniprot”.
- Detección de la localización celular de las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados empleando la herramienta web CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>).
- Detección de aquellas proteínas que albergaran relación con la patogenicidad con la herramienta web MP3 (<http://metagenomics.iiserb.ac.in/mp3/index.php>).
- Análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados empleando el servidor web DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)

Aquellas proteínas que fueron consideradas de interés se sometieron a un estudio más profundo empleando diferentes herramientas web, como el BLASTp y la predicción de dominios del “Genbank”, o de InterProScan.

4. RESULTADOS

4.1. VALORACIÓN DE TRES PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE LA CEPA NAGASAKI DE *Haemophilus parasuis* COMO ANTÍGENOS VACUNALES CONTRA LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER EN CERDOS

4.1.1 Estudio bioinformático preliminar de las proteínas para seleccionar los fragmentos de los genes a clonar

4.1.1.1. Secuencias utilizadas

Las secuencias de las proteínas utilizadas en el estudio preliminar se recogen en la Tabla 18 de la siguiente página.

4.1.1.2. Predicción del péptido señal

El análisis de las secuencias con el servidor “SignalP 4.1” mostró que las tres OMPs presentaban un péptido señal dentro de los primeros 30 aminoácidos de sus extremos N-terminales (Figura 11).

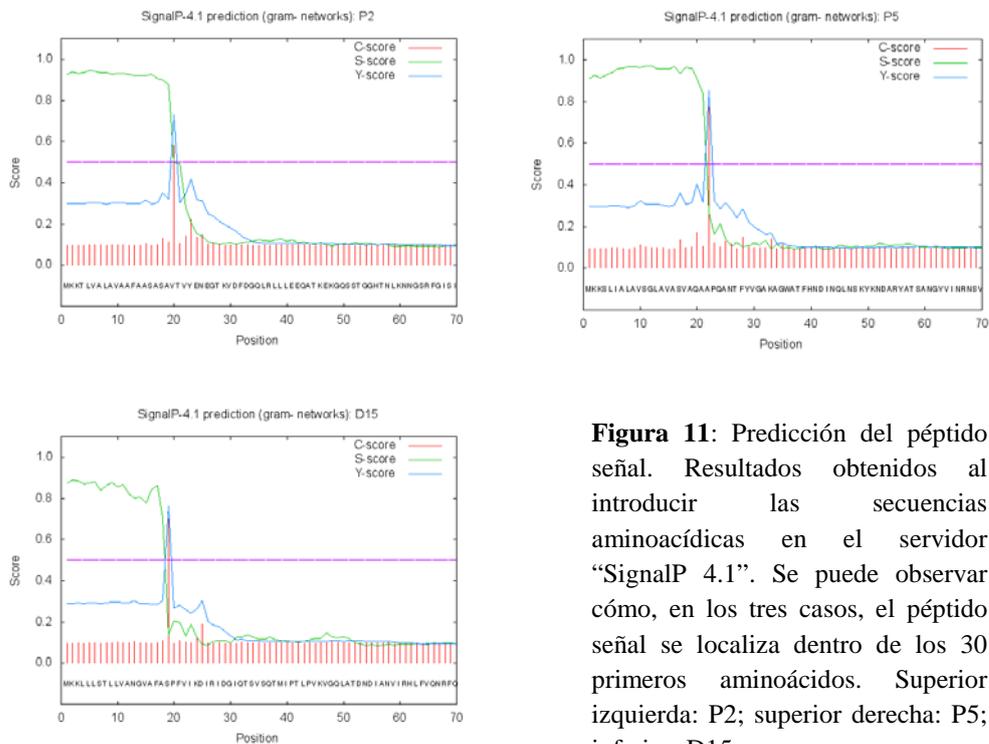


Figura 11: Predicción del péptido señal. Resultados obtenidos al introducir las secuencias aminoacídicas en el servidor “SignalP 4.1”. Se puede observar cómo, en los tres casos, el péptido señal se localiza dentro de los 30 primeros aminoácidos. Superior izquierda: P2; superior derecha: P5; inferior: D15.

PROTEÍNA	SECUENCIA AMINOACÍDICA	CEPA	Nº ACCESO
OMP P2	MKKTLVALAVAAFAASASAVTVYENEGTKVDFDQQLRLLLEEQ ATKEKQSSSTGGHTNLKNNGSRFGISIKHNINENLYGFGRYET RLDSNSKNAAGWDVKTAYAYVGLGGYGHEISFGKQDVIGDSI GQAGFDKVVYGVGTGGIKYSANNTNKKGFDILTSDDSAINYTY TGIEGLTLGANYNVANERDKKTGEVNVGSTKSGFGLGAKYTAK IAESQSVTVAAGYTHDDYKSGSVNKKDKDGVYFGLKYVNAFFT VAVDGGHGVVEKTGNVKEKIDFVRTGARFDVTPKSGVYGNYSYG TYKDKAYKATAHQFMLGADYKLHKQVVTFVEGRLIKNKDSNNK KVTDQALGVGLRVLW	Nagasaki	ACX55073.1
OMP P5	MKKSLLIALAVSGLAVASVAQAAPQANTFYVGAKAGWATFHNDI NQLNSKYKNDARYATSANGYVINRNSVTYGVFGGYQIIDNLAV ELGYDYFGRVIRGNKQEFRAFKAHSAHGTHLSLKPSEYVNLGLDV YKGVGAALVRNDYKRYSTAGVQVQKAHNLKTSVLGAGVEYA ILPELAFRVEYQWLSNVGNFTKAEAKENRRATYNYSPDHSVT AGISYRFGQGAAPVAAPEVVTKNFAFSSDVLFDGKANLKP AAQTLDAVHTEIVNLGLANPAVQVNGYTDRIKDAANLTLKQ RAETVANYIVSKGVNPNVAVGYGEANPVTGNTCDAVKGRKA LITCLAPDRRVEIQVQGSKEVSM	Nagasaki	EPZ99109.1
OMP D15	MKKLLLSTLLVANGVAFASPFVIKDIRIDGIQTSVSTMIPTL PVKVGQLATDNDIANVIRHLFVQNRFNISATREGDILIKVV ENPVINNVDIEGNSAIPKEPLEQNLKANLITKGELEFNSTKLD FKSALIEHYHSIGRYNATIDTVITNSDNGGVNIKLDIKEGDVA YVKAINFEGNQAFSTKVLKQLDIQPDVSWFNIFQSSKFEQTA YNQDLENLRFYMNQGYAKFNVEAEQPVFSDDKKEVSLTYKIN EGIPYTVSEIRIVGNTAKLDNELNEQLKYKGTGELFSKNELSK IEDNIKQVFGNNGFASAKIELHPTFDDTNKTI RLTFVVDAGQR VYVRQIRFEGNDVTADSTLRREMRQOEGAWLSTSLAALGKARL ERTGFYDSVEMSYPNVPNTADQVDIVYKIKERNTGSINFGVGY GTESGLSYQAGIKQDNFLGMGSTISLNGTRNDYGTSINLGYTE PYFTKDGVS LGNIFYEDYDNSKNNSVASYKRQTYGVNSTLGF PVNEYNSYFLGLGYTQDLIKNARREFNRELYVQSMKFPIDNDL NVYKKIKANDFDFSGWNYNSLNRGFLPTEGTLTISGRITTP GSDNKYYKVSIDFKNYLPVNREHKWVISTKANIAYANGFSGKE LPFYQTYTAGGIGSLRGFAYGAIGPKAIYLGKDNGNIRFNSV NGDIVGGNAMASATLELITPTPFVSEKYQHNVRTSLFVDAATV LNTKWKTNPVVNDIQYNYSSLENFKDYKRFRASTGIAFQWNSP IGPLVFSYAKPIKKYQGDEIEQFQFSIGGSF	SH0165	ACL32859.1

Tabla 18: Secuencias aminoacídicas de las tres proteínas objeto de estudio. Se indica la cepa de origen y el número de acceso en el “Genbank”. Para el estudio bioinformático de la OMP D15 se utilizó la cepa SH0165, debido a que la secuencia de la cepa Nagasaki no se encontraba publicada.

4.1.1.3. Búsqueda de motivos y dominios

Los resultados con la herramienta bioinformática “InterProScan” mostraron que la secuencia aminoacídica de la proteína P2 está ocupada en su mayor parte por un barril β y presenta un péptido señal en su extremo N-terminal, como ya se había observado con “SignalP 4.1”. En el caso de la proteína P5, además de encontrar también un péptido señal en los primeros aminoácidos, se reconocen dos dominios. El primero de ellos ocupa los dos primeros tercios de extremo N-terminal, formando un barril β , y es conocido con el nombre de “dominio transmembrana de proteínas tipo OmpA” (IPR000498), mientras que el segundo ocupa el tercio próximo al extremo C-terminal y está constituido por una estructura $\beta/\alpha/\beta/\alpha-\beta$ y se conoce como “dominio tipo OmpA” (IPR006665).

Para la proteína D15, el “InterProScan” reconoció en su mitad C-terminal el dominio conocido como “antígeno superficial bacteriano D15” (IPR000184) y en su mitad N-terminal una repetición en tándem de cinco “dominios POTRA tipo BamA/TamA” (IPR010827). Además, como en el caso de las otras dos proteínas, las secuencias de los primeros aminoácidos del extremo N-terminal portan un péptido señal.

4.1.1.4. Estudio de las estructuras de barril β

Con el programa bioinformático “PRED-TMBB” se estudiaron los barriles β presentes en las tres proteínas. La proteína P2 presenta una estructura de barril β que prácticamente abarca toda su longitud, distinguiéndose 8 lazos extracelulares (Figura 12). El barril β de la proteína P5 comprende los dos tercios del extremo N-terminal de la proteína, coincidiendo con lo observado en el programa “InterProScan”. El número de lazos extracelulares es de 5 (Figura 13). En el caso de la proteína D15 solo se estudiaron los últimos 400 aminoácidos, ya que la mitad N-terminal presenta los dominios POTRA. En la región estudiada se observó un barril β con 10 lazos extracelulares (Figura 14).

	1	2	3	4	5	6
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
0000	MKKT	LVAL	AAFA	ASAV	TVYEN	EGTKVDFD
0060	NNGSR	FGIS	IKHN	INEN	LYGF	GRYETRL
0120	KQDV	IGDS	IGQAG	FDKVV	YVGT	TGGIKY
0180	GANY	NVAN	ERDK	KTGE	VNVG	STKSG
0240	KDKD	GVYF	GLKY	VNAP	FTVA	VDGG
0300	GTYK	DKAY	KATA	HQFM	LGAD	YKLG

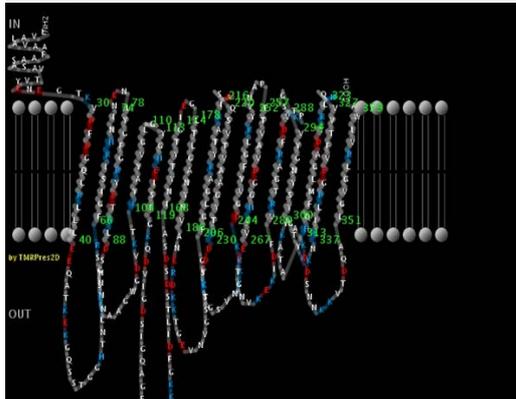


Figura 12: Barril β de P2

Figura superior: Secuencia de la OMP P2, que muestra en azul los aminoácidos constitutivos de los lazos externos; en rojo, los aminoácidos de las regiones transmembrana y en verde, los orientados hacia el espacio periplásmico.

Figura izquierda: representación en dos dimensiones de la estructura de barril β de la proteína. En la zona inferior se muestra el exterior de la célula con los lazos externos.

	1	2	3	4	5	6
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
0000	MKKSL	IALAV	SGLAV	ASVA	QAAP	QANTFY
0060	NGYV	INRNS	VTYGV	FGGY	QIIDN	LAVEL
0120	YEVLN	GLDV	YGKVG	AALVR	NDYKR	YSQT
0180	VEYQ	WLSNV	GNFT	KAEAK	ENRR	ATYNS
0240	AFSS	DVLF	DFGKAN	LKPA	AAQT	LDVH
0300	KRAE	TVANY	IVSK	GVNP	ANVT	AVGY
0360	GSKE	VSM				

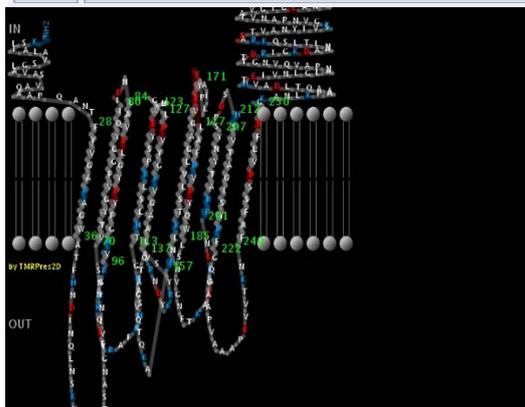


Figura 13: Barril β de P5

Figura superior: Secuencia de la OMP P5, que muestra en azul los aminoácidos constitutivos de los lazos externos; en rojo, los aminoácidos de regiones transmembrana y en verde, los orientados hacia el espacio periplásmico.

Figura izquierda: representación en dos dimensiones de la estructura de barril β de la proteína. En la zona inferior se muestra el exterior de la célula con los lazos externos.

	123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
0000	PNV ^P NTAD ^T QVD ^Q IVY ^V KIK ^K ERNT ^T GS ^S IN ^N FGV ^V GY ^Y G ^G TES ^S GL ^L SY ^Y QAG ^G IK ^K QDN ^N FLGM ^M GST ^T ISL ^L NG ^G TR
0060	NDY ^Y G ^G TS ^S IN ^N LG ^G Y ^Y TE ^E PE ^E Y ^Y FT ^T KD ^D GV ^V SL ^L GG ^G NIF ^F YED ^D YD ^D NS ^S K ^K NN ^N SV ^V ASY ^Y KR ^R Q ^Q TY ^Y GV ^V NST ^T LG ^G FP ^P VNE
0120	YNS ^S Y ^Y FL ^L GL ^L GY ^Y TQ ^Q DL ^L IK ^K NAR ^R REF ^F N ^N RE ^E LY ^Y VQ ^Q SM ^M K ^K FP ^P ID ^D N ^N LN ^N VY ^Y KK ^K IK ^K AN ^N DF ^F DF ^F S ^S FG ^G W ^W NY ^Y NS
0180	LNR ^R G ^G FL ^L P ^P TE ^E GT ^T LS ^S IS ^S GR ^R IT ^T PG ^G SD ^D N ^N K ^K Y ^Y K ^K V ^V S ^S ID ^D F ^F K ^K NY ^Y LP ^P VN ^N RE ^E HK ^K W ^W IS ^S TK ^K ANI ^I AY ^Y ANG
0240	FSG ^G KEL ^L PF ^F Y ^Y Q ^Q TY ^Y TAG ^G G ^G IS ^S LR ^R GF ^F AY ^Y GA ^A IG ^G PK ^K AI ^I YL ^L G ^G DN ^N NG ^G NI ^I R ^R F ^F NS ^S V ^V NG ^G DI ^I VG ^G GN ^N AM ^M AS
0300	AT ^T LE ^E L ^L IT ^T PT ^T PF ^F V ^V SE ^E K ^K Y ^Y QH ^H N ^N VRT ^T SL ^L F ^F V ^V DA ^A TV ^V L ^L NT ^T K ^K WK ^K TN ^N P ^P V ^V V ^V ND ^D I ^I Q ^Q Y ^Y NY ^Y SS ^S LE ^E N ^N FK ^K D ^D Y ^Y K ^K R
0360	FR ^R AST ^T GI ^I AF ^F Q ^Q W ^W NS ^S PI ^I GPL ^L V ^V FS ^S Y ^Y AK ^K PI ^I K ^K Y ^Y Q ^Q GD ^D E ^E IE ^E Q ^Q F ^F Q ^Q S ^S IG ^G GS ^S F

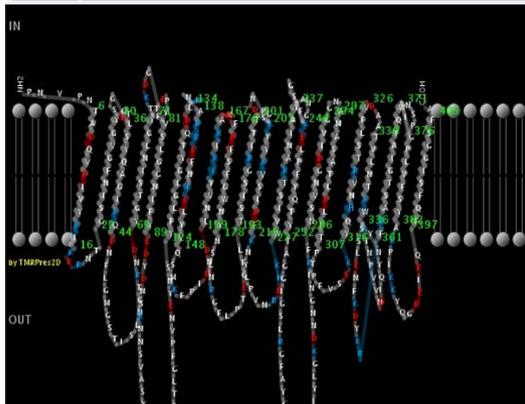


Figura 14: Barril β de D15

Figura superior: Últimos 400 aminoácidos de la proteína D15, que muestra en azul aquellos constitutivos de los lazos externos; en rojo, aquellos de regiones transmembrana y en verde, los orientados hacia el espacio periplásmico.

Figura izquierda: representación en dos dimensiones de la estructura de barril β de la proteína. En la zona inferior se muestra el exterior de la célula con los lazos externos.

4.1.1.5. Comparación de las secuencias de las proteínas P2 y P5 entre la cepa Nagasaki y la cepa SH0165

Con el programa “Lalign” se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias publicadas para las proteínas P2 y P5, entre la cepa objeto de estudio, la Nagasaki, y la cepa donde previamente se habían caracterizado, la SH0165. Se prestó especial interés a los lazos extracelulares, en los cuales, como cabría esperar, se deberían alojar los epítomos accesibles al sistema inmunitaria del hospedador.

En el caso de la secuencia de la proteína P2, de un total de ocho lazos extracelulares, el segundo y quinto, mostraron varias diferencias. El segundo presentó cuatro aminoácidos diferentes de un total de quince. En el quinto lazo, con una longitud de 18 residuos en la cepa SH0165, se observó una delección de cinco aminoácidos en la cepa Nagasaki, además de una sustitución puntual. Además, a excepción de los lazos séptimo y octavo, el resto mostraron una o más sustituciones puntuales por aminoácidos de diferentes propiedades físico-químicas (sustituciones no conservativas). En los lazos tercero y cuarto también se observaron dos sustituciones puntuales por aminoácidos de similares propiedades (sustituciones conservativas) (Figura 15).

En la OMP P5, que presenta cinco lazos extracelulares, en dos de ellos se observaron diferencias en su secuencia. En el primer lazo se apreciaron hasta seis sustituciones puntuales no conservativas entre las dos cepas, además de cuatro sustituciones conservativas. En el cuarto lazo, hasta seis aminoácidos de la cepa SH0165 de un total de 17 resultaron sustituidos en la cepa Nagasaki de forma no conservativa, junto con otros tres aminoácidos que fueron sustituidos de forma conservativa. En los lazos restantes no se apreciaron diferencias entre las cepas salvo en el quinto, donde simplemente se apreció una sustitución conservativa (Figura 16).

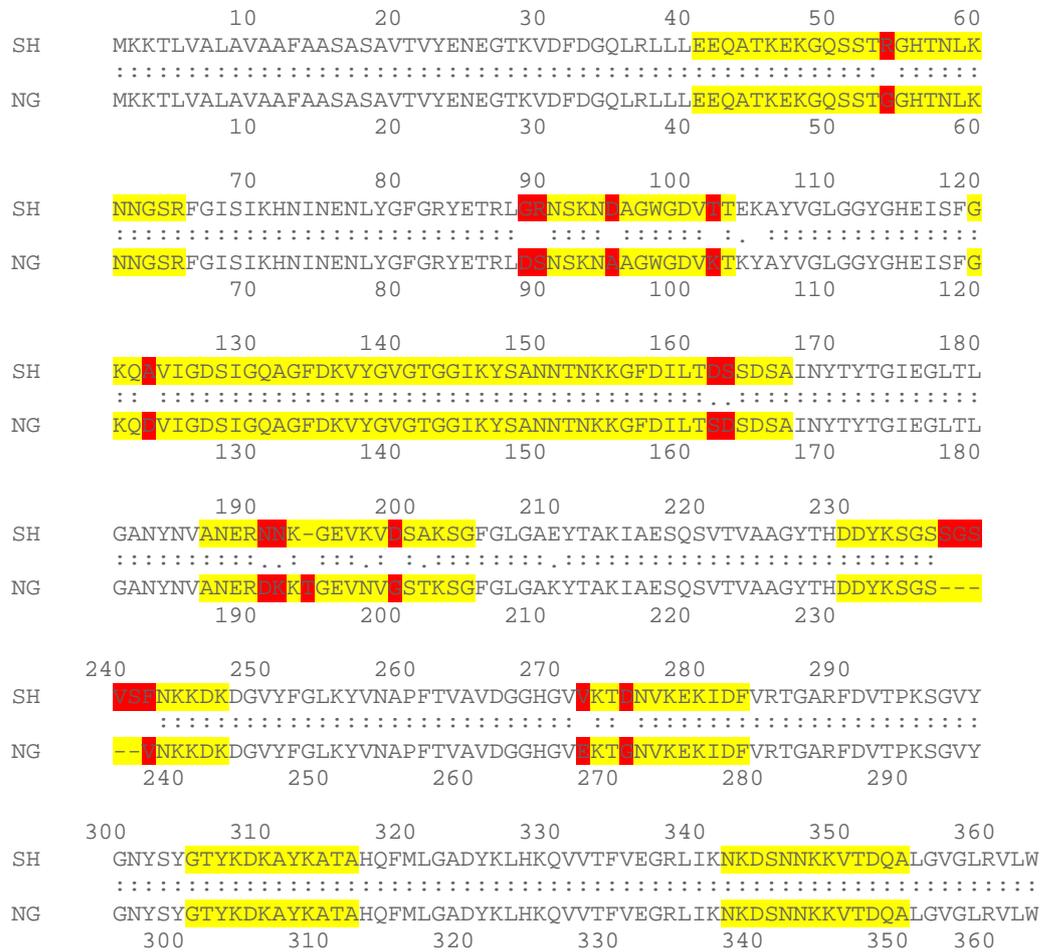


Figura 15: Alineamiento de las secuencias proteicas de la P2 entre SH0165, líneas superiores, y Nagasaki, líneas inferiores. En amarillo se muestran los lazos extracelulares y en rojo, las diferencias observadas entre ambas cepas en los lazos. De ellas, con un punto se identifican las sustituciones puntuales por aminoácidos de propiedades físico-químicas similares (conservativas), mientras que con un espacio en blanco se muestran las sustituciones por aminoácidos de diferentes propiedades (no conservativas).

```

      10      20      30      40      50      60
SH  MKKSLIALAVSGLAVASVAQAAPQANTFYVGAKAGWATFHNDINQIDSKYINDARYDTR
    :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::.....:
NG  MKKSLIALAVSGLAVASVAQAAPQANTFYVGAKAGWATFHNDINQINSKYINDARYINS
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
SH  RNYIIRNSVTYGVFGGYQIIDNLAVELGYDYFGRVRGNKQEFRAFKHSAHGTHLSLKPS
    :.....:
NG  RNYIIRNSVTYGVFGGYQIIDNLAVELGYDYFGRVRGNKQEFRAFKHSAHGTHLSLKPS
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160     170     180
SH  YEVLNGLDVYGVKVGAAALVRNDYKRYSTAGVQTQKAHNLKTSLVLGAGVEYAILPELAFR
    :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
NG  YEVLNGLDVYGVKVGAAALVRNDYKRYSTAGVQTQKAHNLKTSLVLGAGVEYAILPELAFR
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
SH  VEYQWLSVGNVKAARKKDTAMFPGSTYSPDAHVSAGISYRFGQGAAPVAAPEVV
    ::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
NG  VEYQWLSVGNVKAARKKRRATYN---YSPDHSVTAGISYRFGQGAAPVAAPEVV
      190     200     210     220     230

      250     260     270     280     290     300
SH  TKNFAFSSDVLFDGKANLKPAAAQTLDAVHTEIVNLGLANPAVQVNGYTDRIGKDAANL
    :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
NG  TKNFAFSSDVLFDGKANLKPAAAQTLDAVHTEIVNLGLANPAVQVNGYTDRIGKDAANL
      240     250     260     270     280     290

      310     320     330     340     350     360
SH  TLSQKRAETVANYIVSKGVNPANVTAVGYGEANPVTGNTCDAVKGRKALITCLAPDRRVE
    :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
NG  TLSQKRAETVANYIVSKGVNPANVTAVGYGEANPVTGNTCDAVKGRKALITCLAPDRRVE
      300     310     320     330     340     350

      370
SH  IQVQGSKEVSM
    ::::::::::::::
NG  IQVQGSKEVSM
      360

```

Figura 16: Alineamiento de las secuencias proteicas de la P5 entre SH0165, líneas superiores, y Nagasaki, líneas inferiores. En amarillo se muestran los lazos extracelulares y en rojo, las diferencias observadas entre ambas cepas en los lazos. De ellas, con un punto se identifican las sustituciones puntuales por aminoácidos de propiedades físico-químicas similares (conservativas), mientras que con un espacio en blanco se muestran las sustituciones por aminoácidos de diferentes propiedades (no conservativas).

4.1.2. Producción de proteínas recombinantes de la membrana externa

4.1.2.1. Amplificación y clonación de los fragmentos génicos

Con las parejas de oligonucleótidos n1p2-rp2, n1p5-rp5 y nd15-cd15 se amplificaron las secuencias completas de los genes que codificaban para las proteínas P2 y P5 mediante PCR, a excepción de la parte correspondiente al péptido señal, así como un fragmento génico que codificaba la parte de la región C-terminal de la D15. Los amplicones resultantes mostraron un tamaño compatible con el esperado, de 987 pares de bases (pb) para el fragmento que codificaba a la P2, de 1.008 pb para el de P5 y 1386 pb para el de D15 (Imagen 8).

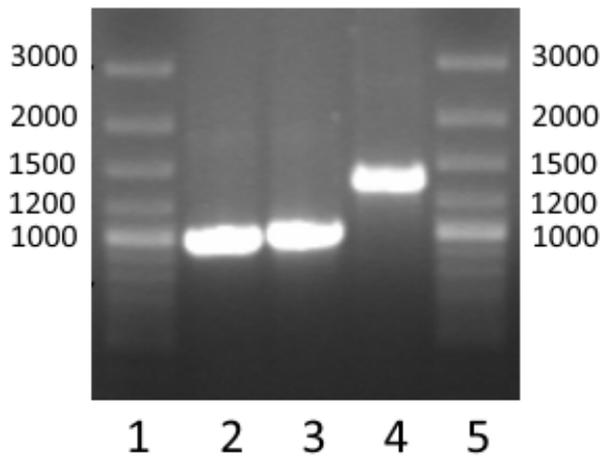


Imagen 8:

Electroforesis con amplicones de los genes a clonar.

Carriles 1 y 5: Marcador molecular “GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder”.

Carril 2: Amplicón de P2

Carril 3: Amplicón de P5

Carril 4: Amplicón de D15

Para cada proteína, tal como se describe en el apartado correspondiente de “Material y Métodos”, su amplicón resultante fue purificado e insertado en un vector “pBAD/Thio-TOPO®” y, posteriormente, el plásmido recombinante generado fue utilizado para transformar *E. coli* de la cepa Top10 (Imagen 9).

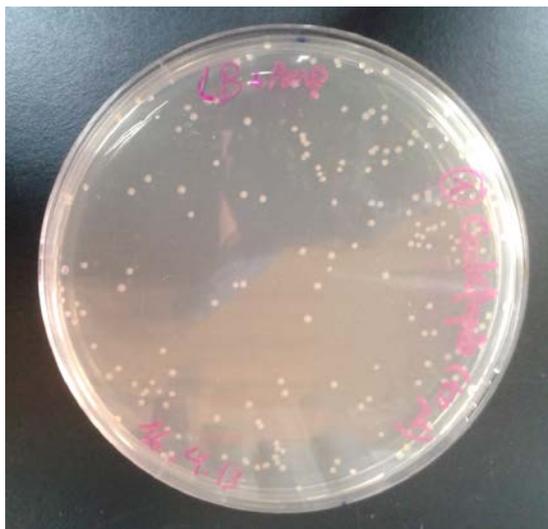


Imagen 9:

Colonias de transformantes. Placa de agar LB con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) en la que se inoculó una alícuota de bacterias sometidas a transformación. A las 24 horas de incubación se pueden apreciar las colonias de transformantes.

Los transformantes obtenidos fueron probados primero mediante una PCR, utilizando el mismo cebador *forward* del fragmento génico y un cebador *reverse* (pbadrv) que hibridaba más abajo del fragmento génico amplificado. De esta forma, se consideró que aquellos transformantes positivos a esta prueba portaban el plásmido recombinante con el fragmento orientado en el sentido correcto y fueron enviados a secuenciar.

Una vez efectuada la secuenciación, se seleccionaron aquellos transformantes que presentaran una secuencia idéntica a la publicada en la base de datos del “Genbank” para la cepa Nagasaki (P2 y P5) o de la cepa SH0165 (D15). En el caso de la P2, todos los transformantes secuenciados presentaron una sustitución puntual de una adenosina original por una timidina en la posición 1.455 del marco de lectura abierto (ORF) que codificaba la proteína recombinante Thio-P2-V5-6xHis (equivalente a la posición 1.038 de la ORF del gen que codifica la OMP P2). Dicha sustitución no afectaba a la secuencia aminoacídica resultante. Para la P5 se consiguió obtener transformantes, cuyas secuencias fueron exactamente iguales a la ORF publicada. En el caso de la D15, a pesar de que la secuencia utilizada como referencia procedía de otra cepa (SH0165), no apreciamos ninguna diferencia en la región amplificada y clonada de la cepa Nagasaki.

El ADN plasmídico de los transformantes Top10 seleccionados se utilizó para transformar células LMG194. Con ellas, se empleó el mismo método de selección de transformantes mediante PCR y secuenciación.

4.1.2.2. Expresión, extracción y purificación proteica

Tras la inducción de la expresión proteica mediante la adición de arabinosa al crecimiento bacteriano de las bacterias de *E. coli* transformadas con los vectores correspondientes, la masa celular fue recogida por centrifugación y sometida a una extracción de la fracción soluble proteica, seguida de un proceso para extraer la fracción proteica insoluble en presencia de urea. Por SDS-PAGE se comprobó que, en los tres casos, las proteínas recombinantes se localizaban en la fracción insoluble. En ella se pudo apreciar, para cada caso, una banda intensa correspondiente con el peso molecular esperado de la proteína recombinante en cuestión (Imagen 10). Dicho peso fue establecido previamente con la herramienta bioinformática “Protein Molecular Weight” y resultó ser de 52 kDa para la P2, de 53 kDa para la P5 y de 68 kDa para la D15.

Para cada proteína, la fracción insoluble fue sometida a una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), como se describe en el apartado correspondiente de “Material y Métodos”, para permitir la renaturalización y purificación en paralelo. Al terminar dicho proceso, se obtuvieron eluidos en los que, después de ser examinados por SDS-PAGE, solo se apreciaba una única banda proteica, con el tamaño predicho para cada proteína recombinante.

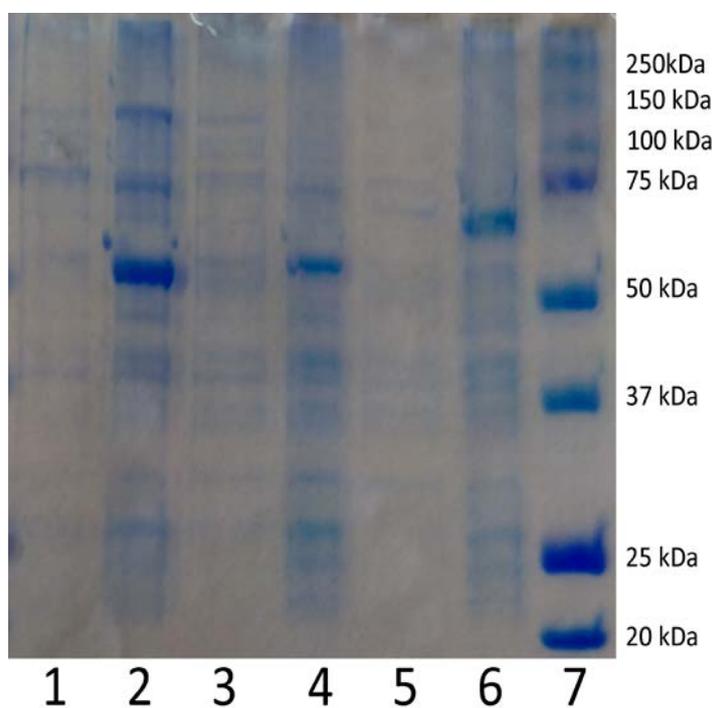


Imagen 10: SDS-PAGE tras extracción proteica. Se muestran las fracciones solubles e insolubles de la extracción proteica procedente de las tres *E. coli* transformantes portadoras de los plásmidos con los genes codificantes de las proteínas. Las líneas 1 y 2 corresponden a la fracción soluble e insoluble respectivamente, del transformante portador del gen de P2. Las líneas 3 y 4 se corresponden a la fracción soluble e insoluble del transformante de P5 y las líneas 5 y 6 lo mismo para el transformante para D15. La línea 7 muestra el marcador “Precision Plus Protein™ Dual Color Standards”. Se puede apreciar como en las tres fracciones insolubles la banda más intensa se corresponde con un peso molecular compatible con el peso molecular calculado para las proteínas de fusión (52 kDa para la P2, 53 kDa para la P5 y 68 kDa para la D15).

4.1.2.3. Reconocimiento de las proteínas recombinantes por inmunoglobulinas G de suero procedente de cerdos previamente expuestos a *Haemophilus parasuis*

Una vez purificadas las bandas proteicas, se emplearon sueros que procedían de una prueba experimental realizada en el pasado (Fransoloso *et al.*, 2015), para verificar que las proteínas obtenidas eran capaces de ser reconocidas por suero de cerdos previamente expuestos a la bacteria

Mediante ELISA indirecto en placas tapizadas con las proteínas recombinantes se observó que el suero procedente de cerdos previamente expuestos a la bacteria (inmunizados con una bacterina comercial del mismo serotipo que la cepa Nagasaki y desafiados con la cepa Nagasaki) mostraba una densidad óptica (450 nm) significativamente más elevada ($p < 0,01$) que el procedente de los animales control (criados en las mismas condiciones, pero sin inmunizar ni desafiar). Además, al comparar ambos grupos en el momento anterior a la inmunización del grupo expuesto, no se apreciaron diferencias significativas. Al comparar dentro de un mismo grupo ambos momentos, solo se observaron diferencias significativas en el grupo de animales que estuvieron en contacto con *H. parasuis* ($p < 0,01$) (Figura 17).

Coincidiendo con lo anterior, los *Western blots* realizados mostraron que el suero procedente de los animales previamente expuestos a la bacteria era capaz de reconocer las tres proteínas recombinantes, mientras que el suero de los animales control no las reconocía (Imagen 11).

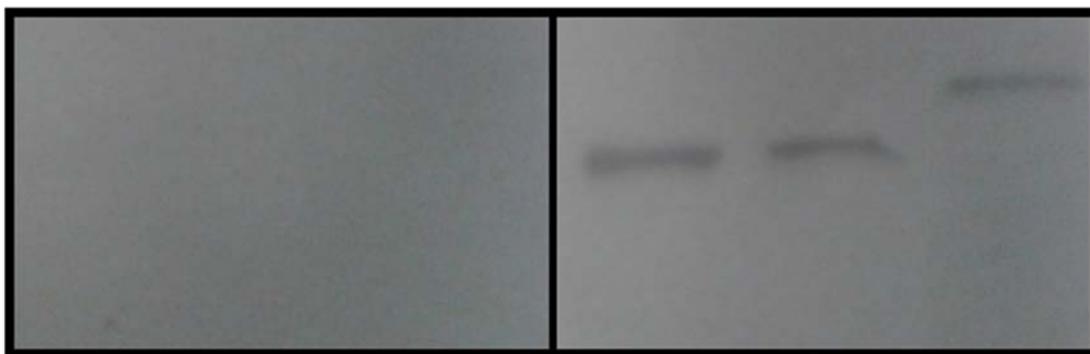


Imagen 11: *Western blots* realizados con suero procedente de un animal control (izquierda) o expuesto a la bacteria (derecha). Las membranas sobre las que se realizaron los *Western blots* procedían de transferencias a partir de un gel de poliacrilamida en el que se habían sometido a PAGE las tres proteínas (P2 a la izquierda, P5 en el centro y D15 a la derecha). Como se puede observar, solamente el suero de animal expuesto fue capaz de reconocer las proteínas recombinantes.

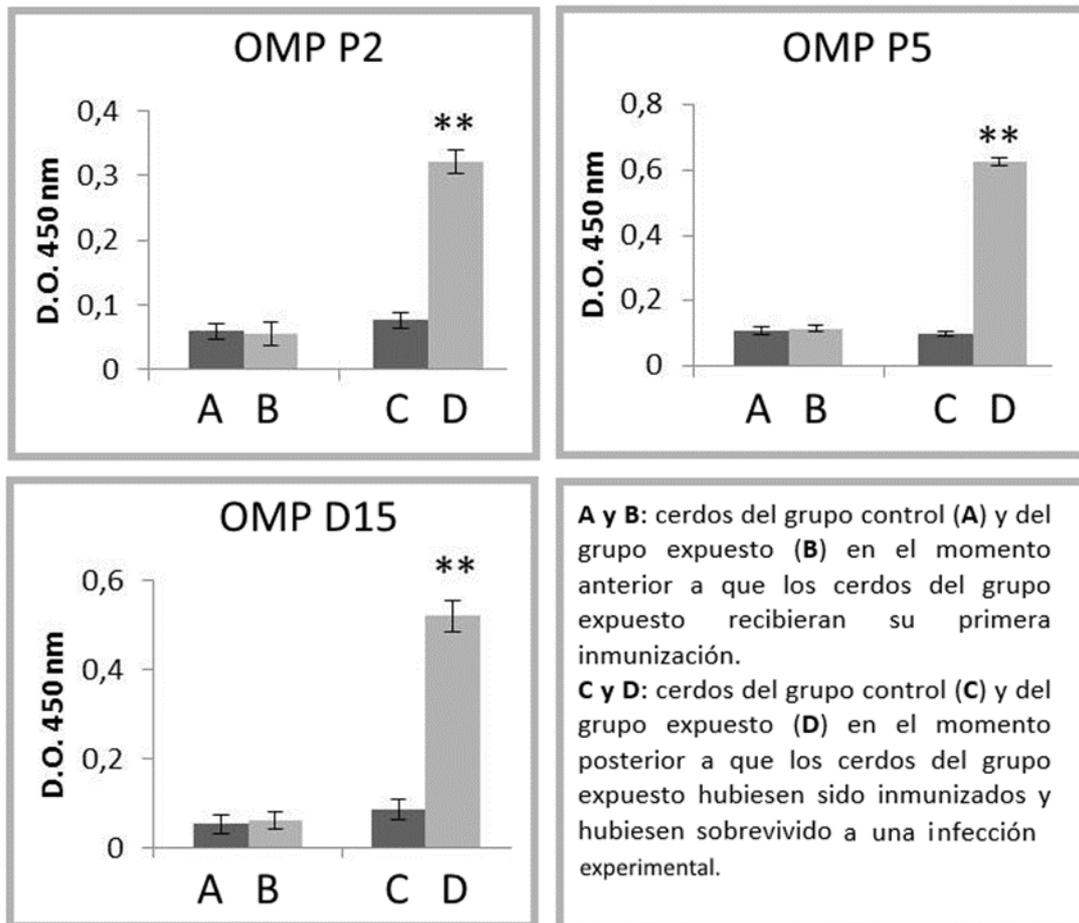


Figura 17: ELISAs indirectos para comprobar el reconocimiento de las proteínas por sueros de cerdos expuestos a la bacteria. Se muestra la densidad óptica a 450 nm tras enfrentar sueros obtenidos en un estudio anterior, procedentes de cerdos control (gris oscuro) y de cerdos previamente expuestos a *H. parasuis* (gris claro) en placas tapizadas con P2 (gráfica superior izquierda), P5 (gráfica superior derecha) y D15 (gráfica inferior izquierda). El doble asterisco indica diferencias significativas con el grupo de animales control ($p < 0,01$). Se representan dos momentos para cada proteína y grupo experimental; por un lado, el momento en que los cerdos del grupo expuesto todavía no habían sido inmunizados y, por otro, el instante en que los cerdos expuestos ya habían recibido sus inmunizaciones y sobrevivido a la infección experimental.

4.1.3. Valoración de la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes en conejos

Las tres proteínas recombinantes producidas fueron empleadas para inmunizar conejos y valorar si producían IgGs específicas capaces de reconocer la bacteria completa. Mediante ELISAs indirectos se enfrentaron placas tapizadas con las proteínas P2, P5 ó D15 a sueros del grupo de conejos inmunizados con la correspondiente proteína o a sueros de un grupo de conejos sin inmunizar. En los tres casos, después de la primera inmunización se pudieron observar diferencias significativas ($p < 0,05$) en las mediciones de densidad óptica a 450 nm entre el grupo inmunizado y el control. Los valores más altos de anticuerpos se observaron después de la tercera inmunización, cuando las diferencias entre el grupo control y el inmunizado correspondiente fueron más destacadas ($p < 0,01$) (Figura 18).

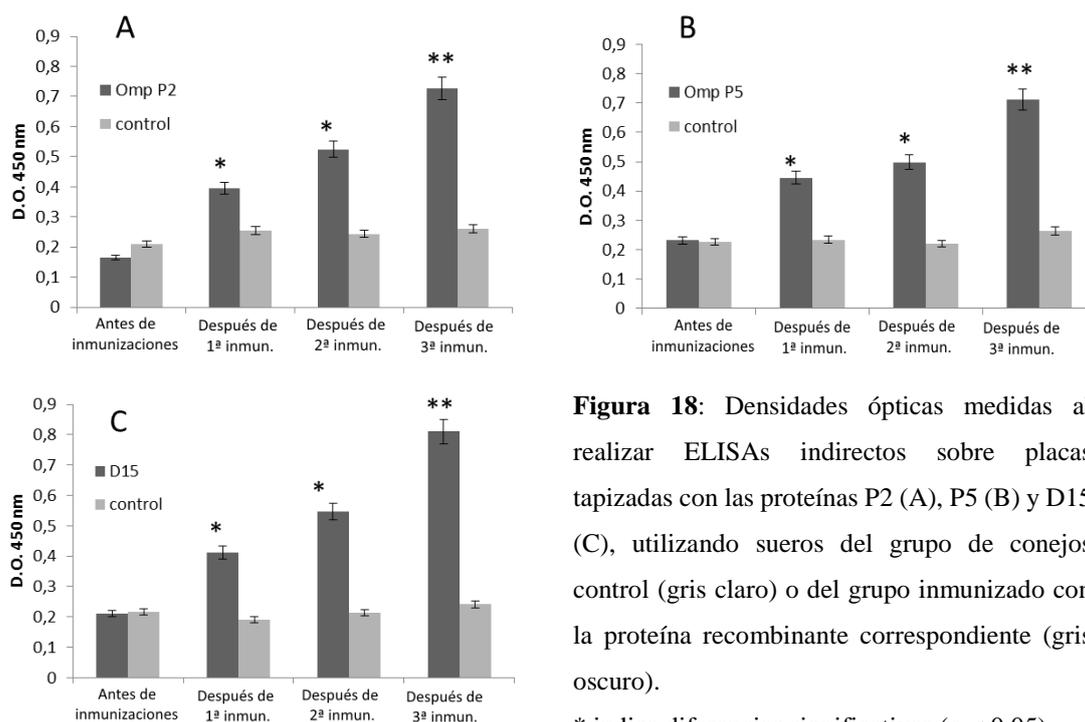


Figura 18: Densidades ópticas medidas al realizar ELISAs indirectos sobre placas tapizadas con las proteínas P2 (A), P5 (B) y D15 (C), utilizando sueros del grupo de conejos control (gris claro) o del grupo inmunizado con la proteína recombinante correspondiente (gris oscuro).

* indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

** indica diferencias significativas ($p < 0,01$).

Cuando los sueros de los diferentes grupos de conejos inmunizados y del grupo control fueron investigados mediante ELISA indirecto frente a placas tapizadas con *H. parasuis* se pudo observar que, a partir de la segunda inmunización, los tres grupos de

conejos inmunizados con alguna de las proteínas recombinantes presentaban diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo de conejos control (Figura 19).

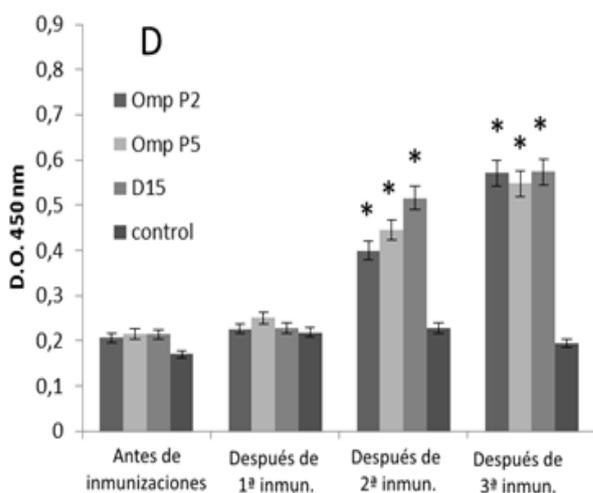


Figura 19: Densidades ópticas medidas al realizar ELISAs indirectos tapizando con la bacteria entera, utilizando sueros procedentes del grupo control de conejos y de cada uno de los grupos inmunizado con una de las proteínas.

*indica que se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo correspondiente y el grupo control.

4.1.4. Valoración de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes frente a *Haemophilus parasuis* en cerdos privados de calostro

4.1.4.1. Infección experimental

4.1.4.1.1. Signos clínicos y supervivencia

Después del desafío de los cerdos con una dosis letal de la cepa Nagasaki (Imagen 12), se valoró la sintomatología de los animales (disnea, apatía, postración o cojeras); además, se midió la temperatura rectal cada 12 horas, considerando que se producía hipertermia cuando era superior a 39,5 °C. En caso de observarse signos de sufrimiento, se procedió a su eutanasia humanitaria. En la Tabla 19 se indican los porcentajes de mortalidad en diferentes momentos para cada grupo de animales desafiado.

Dos cerdos pertenecientes al grupo de la proteína P5, otro perteneciente al grupo de la D15 y otros dos del grupo control sin inmunizar (NI) fueron eutanasiados antes de las 12 horas porque se apreciaron importantes signos de sufrimiento. A las 12 horas del desafío, el resto de los animales pertenecientes al grupo control sin inmunizar, así como

los grupos inmunizados con alguna de las proteínas o con las tres en conjunto, habían comenzado a desarrollar sintomatología, del tipo de disnea e hipertermia.

Entre las 12 y 24 horas fue necesario eutanasiar otros dos cerdos, uno perteneciente al grupo de inmunizados con las tres proteínas y otro del grupo control sin inmunizar. A las 24 horas, la hipertermia y disnea se hicieron más intensas que en la medición anterior, con postración en muchos animales. En el caso de los cerdos inmunizados con la bacterina comercial, también se observaron signos de disnea e hipertermia, pero más moderados que en el conjunto de animales.

Entre las 24 y 36 horas, se eutanasiaron once animales para evitar su sufrimiento puesto que presentaban sintomatología más acusada que el resto. Cinco de ellos pertenecían al grupo control sin inmunizar, tres al grupo de la P2 y otros tantos al grupo de la D15. A las 36 horas, los animales restantes continuaban mostrando síntomas de enfermedad y nuevamente fueron menos intensos en los animales vacunados con la bacterina comercial.

Entre las 36 y 48 horas, se aplicó eutanasia al resto de los cerdos de los grupos control sin inmunizar y de los grupos inmunizados con alguna de las proteínas o con las tres simultáneamente. De ellos, cinco pertenecían al grupo control sin inmunizar, uno al grupo de la proteína P2, dos al grupo de la P5 y tres al grupo de las tres proteínas.

A las 48 horas, solo permanecían con vida los animales pertenecientes al grupo inmunizado con la bacterina comercial. Estos cerdos seguían presentando una leve sintomatología, que remitió completamente a las 72 horas posteriores. Después de dos semanas, se procedió a la eutanasia humanitaria de estos animales. Los animales del grupo restante, no inmunizados ni desafiados, no mostraron síntoma alguno, como cabía esperar.

Grupo	< 12 h	12 a 24 h	24 a 36 h	36 a 48 h	> 48 h
Control NI	15,4%	7,7%	38,5%	38,5%	0%
P2	0%	0%	75%	25%	0%
P5	50%	0%	0%	50%	0%
D15	25%	0%	75%	0%	0%
3 proteínas	0%	25%	0%	75%	0%
bacterina	0%	0%	0%	0%	100%

Tabla 19: Porcentajes de muertes en los diferentes grupos experimentales de cerdos.



Imagen 12: Desafío intratraqueal.

4.1.4.1.2. Lesiones macroscópicas

En la Tabla 20 se resumen los diferentes hallazgos macroscópicos agrupados por grupos experimentales: los animales controles desafiados pero no inmunizados (NI), los inmunizados con la bacterina comercial, los inmunizados con la proteína P2, los inmunizados con la P5, los inmunizados con la D15 y aquellos inmunizados con las tres proteínas recombinantes de forma simultánea. Para la elaboración de dicha Tabla solo se tuvieron en cuenta aquellos animales fallecidos a partir de las 12 horas después del desafío. Se planteó así porque los cerdos fallecidos antes de este periodo y, por tanto, tan súbitamente (tres animales del grupo NI, dos del de la P5 y uno del de la D15), al presentar un cuadro hiperagudo desarrollaron menos lesiones que los demás animales, por lo que se optó por no incluirlos para que no representasen un sesgo. Sus lesiones, de estar presentes, fueron menos evidentes que las de sus compañeros.

		NI n= 11*	Bacterina n= 3	P2 n=4	P5 n=2*	D15 n=3*	3 prot. n=4
Meninges congestivas		5 (45,4%)	0 (0%)	1 (25 %)	1 (50%)	2 (66,7%)	0 (0%)
Signos de neumonía		8 (73,3 %)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (75%)
Hiperplasia de la pulpa blanca		8 (73,3%)	3 (100%)	2 (50%)	2 (100%)	3 (100%)	1 (25%)
Presencia de exudado	Cavidad pleural	11 (100%)	1 (33,3%)	2 (50%)	0 (0%)	2 (66,7%)	3 (75%)
	Cav. pericárdica	8 (73,3%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	3 (100%)	3 (75%)
	Cav. abdominal	5 (45,4%)	0 (0%)	3 (75%)	2 (100%)	3 (100%)	1 (25%)
	Carpo	11 (100%)	0 (0%)	3 (75%)	2 (100%)	3 (100%)	3 (75%)
	Tarso	11 (100%)	1 (33,3%)	4 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	3 (75%)
Presencia de depósitos de fibrina	Cavidad pleural	11 (100%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	2 (66,7%)	1 (25%)
	Cav.pericárdica	11 (100%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	1 (33,3%)	2 (50%)
	Cav.abdominal	11 (100%)	2 (66,7%)	4 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	1 (25%)
	Carpo	5 (45,4%)	0 (0%)	2 (50%)	2 (100%)	3 (100%)	3 (75%)
	Tarso	3 (27,7%)	0 (0%)	4 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	3 (75%)
Reactividad ganglionar	G. mandibular	11 (100%)	0 (0%)	2 (50%)	2 (100%)	2 (66,7%)	3 (75%)
	G. mediastínico	3 (27,7%)	0 (0%)	2 (50%)	2 (100%)	1 (33,3%)	1 (25%)
	G. tráqueo-bronquial	11 (100%)	0 (0%)	3 (75%)	2 (100%)	2 (66,7%)	2 (50%)

Tabla 20: Lesiones macroscópicas observadas en los animales durante la necropsia. Se indica el número de animales de cada grupo que presentaron cada lesión, así como el porcentaje sobre el total del grupo. El asterisco indica que en el grupo correspondiente había animales fallecidos antes de que transcurrieran doce horas desde el desafío, que no fueron contabilizados.

En las siguientes imágenes se muestran algunas de las diferentes lesiones macroscópicas observadas durante las necropsias.



Imagen 13: Pleuritis fibrinosa de un cerdo perteneciente al grupo control no inmunizado. Se pueden apreciar adherencias entre las pleuras parietal y visceral.

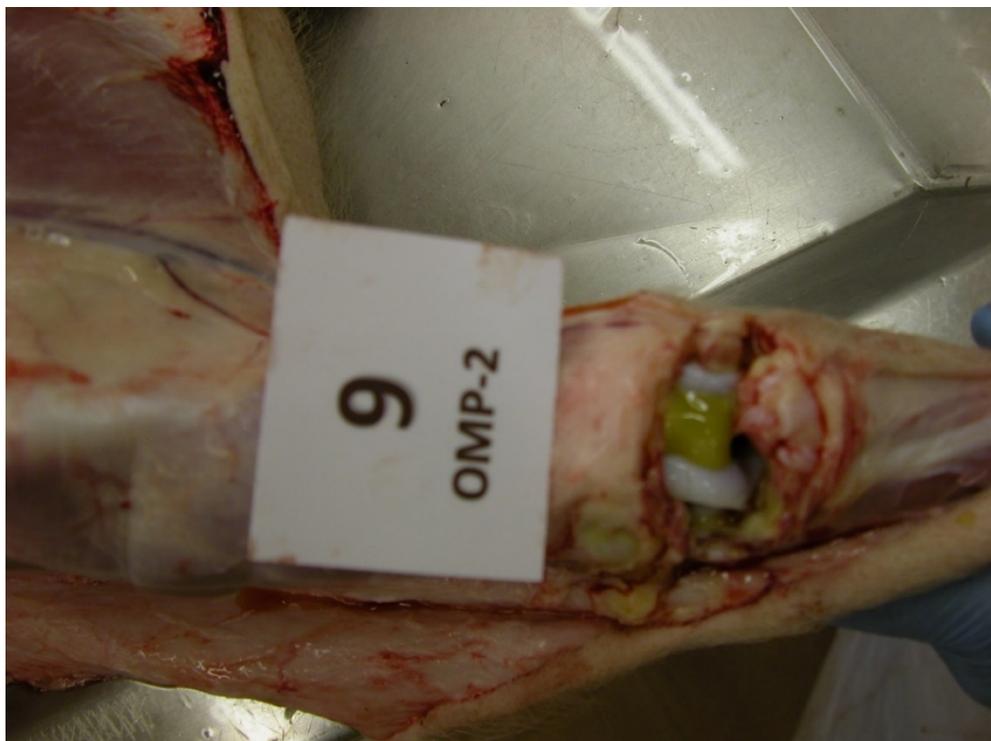


Imagen 14: Artritis fibrinoso-purulenta en el tarso de un cerdo del grupo de inmunizados con la proteína P2.

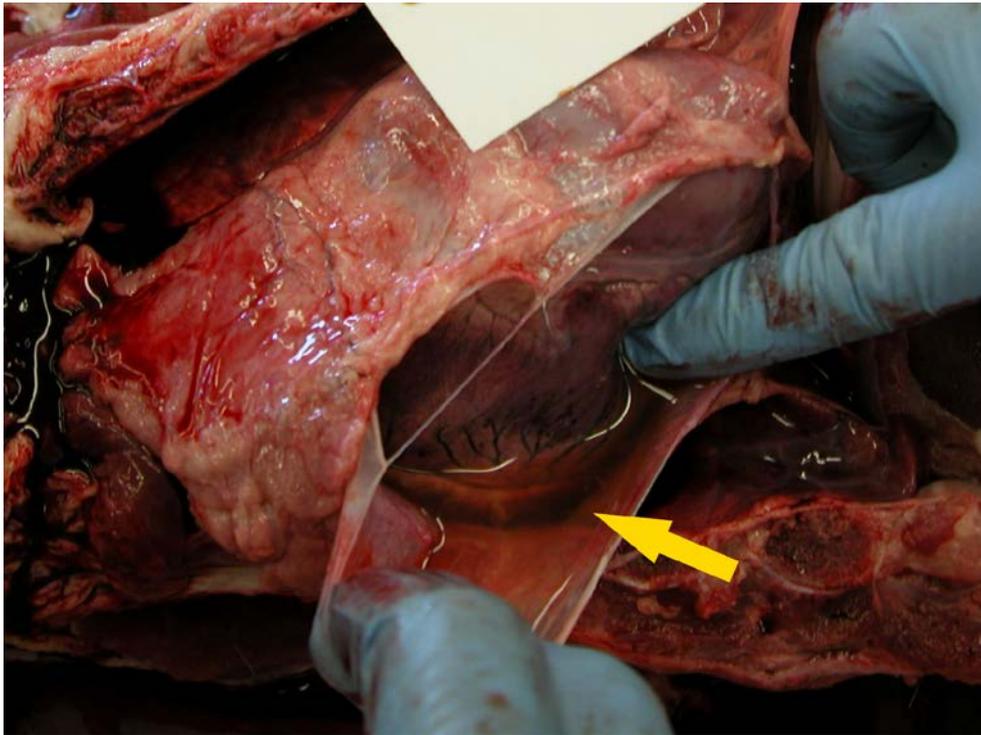


Figura 15: Presencia de exudado en el pericardio de un cerdo del grupo control no inmunizado.



Imagen 16: Ascitis y presencia de fibrina en la cavidad abdominal en un cerdo inmunizado con la proteína P5.

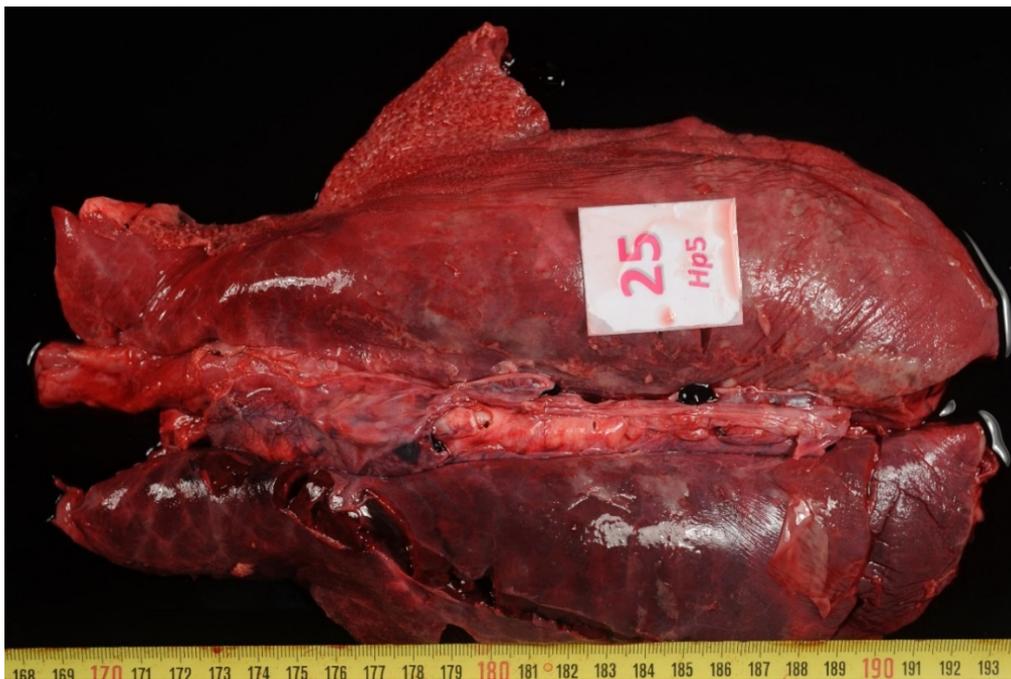


Imagen 17: Pulmones de un cerdo perteneciente al grupo control no inmunizado, que presentó una neumonía evidente.

4.1.4.1.3. Lesiones microscópicas

En los animales del grupo inmunizado con las tres proteínas, en los pertenecientes al grupo de vacunados con la bacterina comercial y en cuatro animales seleccionados al azar entre aquellos del grupo control no inmunizado (NI) que no fallecieron antes de 12 horas después del desafío, se valoraron las lesiones microscópicas. En la Tabla 21 se muestran los hallazgos histológicos más relevantes, asignando una puntuación media por grupo experimental en una escala de 0 a 3, donde 0 significa ausencia de la lesión correspondiente.

ÓRGANO	LESIONES	Bacterina (n=3)	3 Proteínas (n=4)	Control NI (n=4)
ENCÉFALO	Hemorragias en parénquima	0	0,5	1
	Encefalitis en parénquima	0	0	0
MENINGES	Hemorragias en meninges	0	1	1,5
	Meningitis fibrino/purulenta	0	3	1,5
PULMÓN	Hemorragias intraalveolares	0,5	2,5	2
	Exudado de fibrina en alveolos	0	2	2
	Células inflamatorias	0,5	2	2,5
PLEURA	Pleuritis fibrinosa	0	1	3
	Trombos	0	0	2
BAZO	Hiperplasia linfoide	1	0,5	0,5
	Infiltrado histiocitario	0,5	1	2,5
	Infiltrado de neutrófilos	0	0,5	0
	Necrosis de linfocitos	0	0,5	0,5

Tabla 21: Lesiones microscópicas presentes en los grupos inmunizados con la bacterina comercial, con las tres proteínas y en el grupo control sin inmunizar. Se calculó una media para cada grupo experimental de la puntuación obtenida para cada lesión microscópica en una escala desde 0 a 3, donde “0” significa ausencia de la lesión correspondiente. Entre paréntesis, se indican las imágenes donde se aprecian ejemplos de las lesiones observadas.

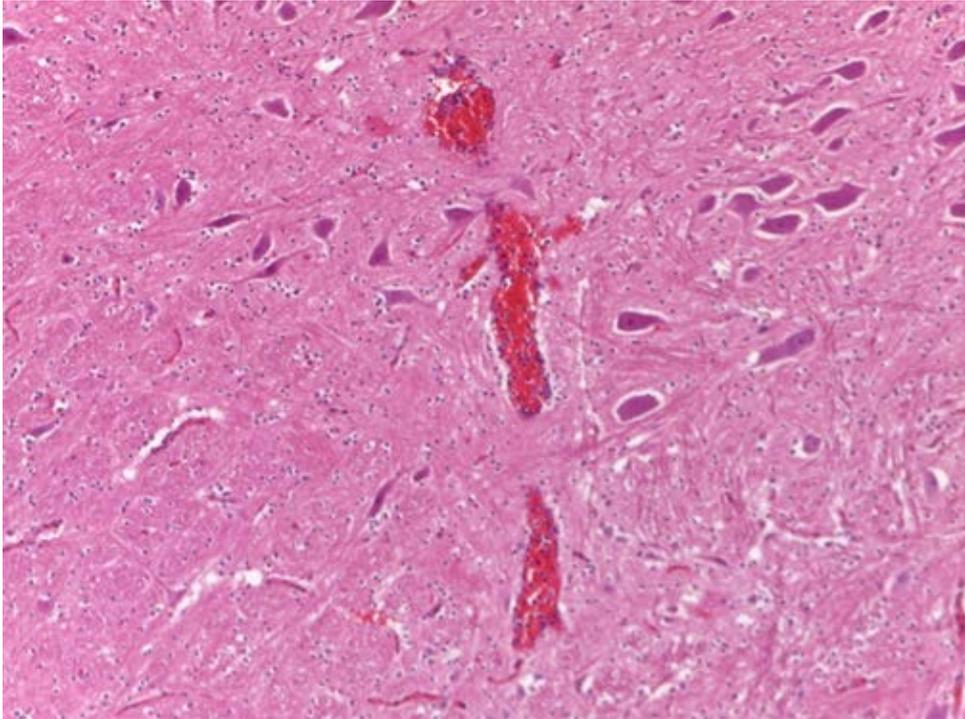


Imagen 18: Hemorragias en el encéfalo de un cerdo perteneciente al grupo control NI. Tinción con hematoxilina-eosina (100 aumentos (x)).

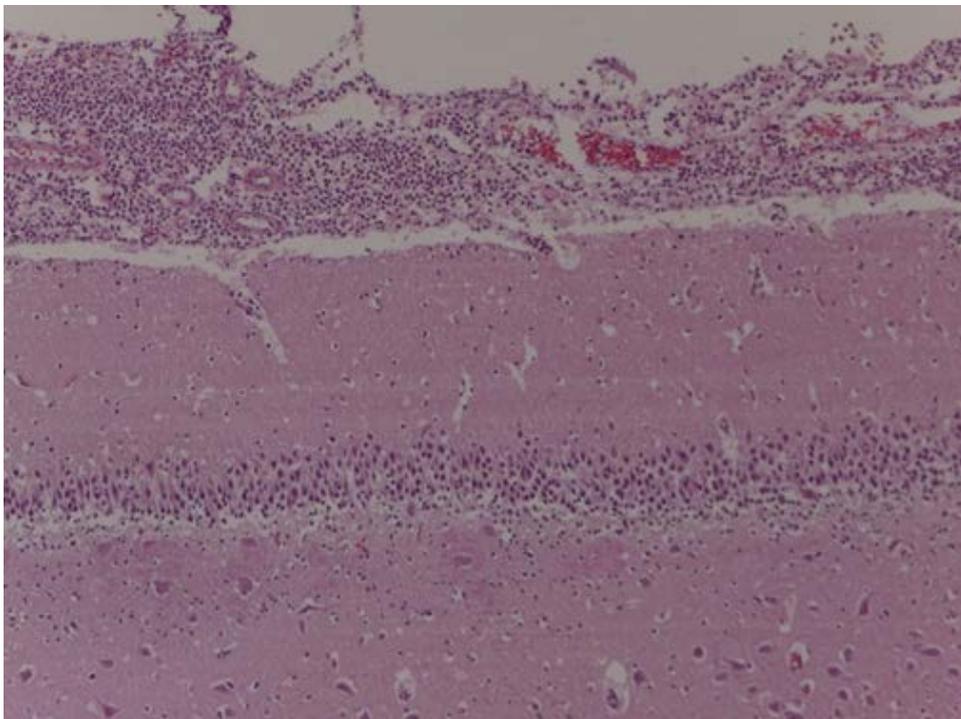


Imagen 19: Meningitis fibrinoso-purulenta intensa en un cerdo inmunizado con las tres proteínas. Tinción con hematoxilina-eosina (100x).

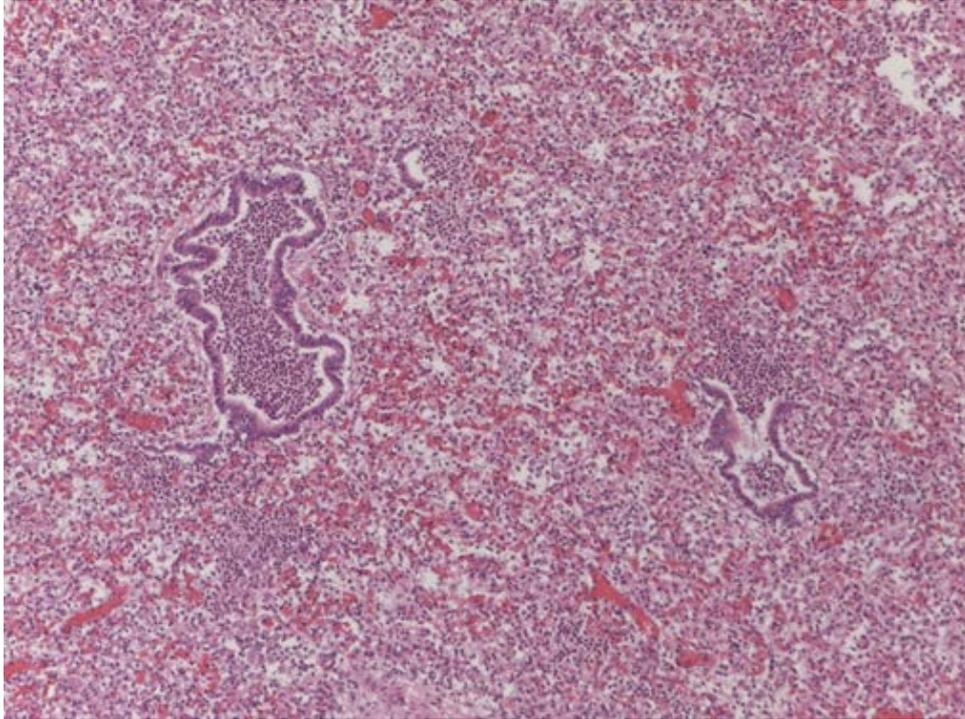


Imagen 20: Pulmón con una neumonía exudativa, procedente de un cerdo inmunizado con las tres proteínas. Tinción con hematoxilina-eosina (100×).

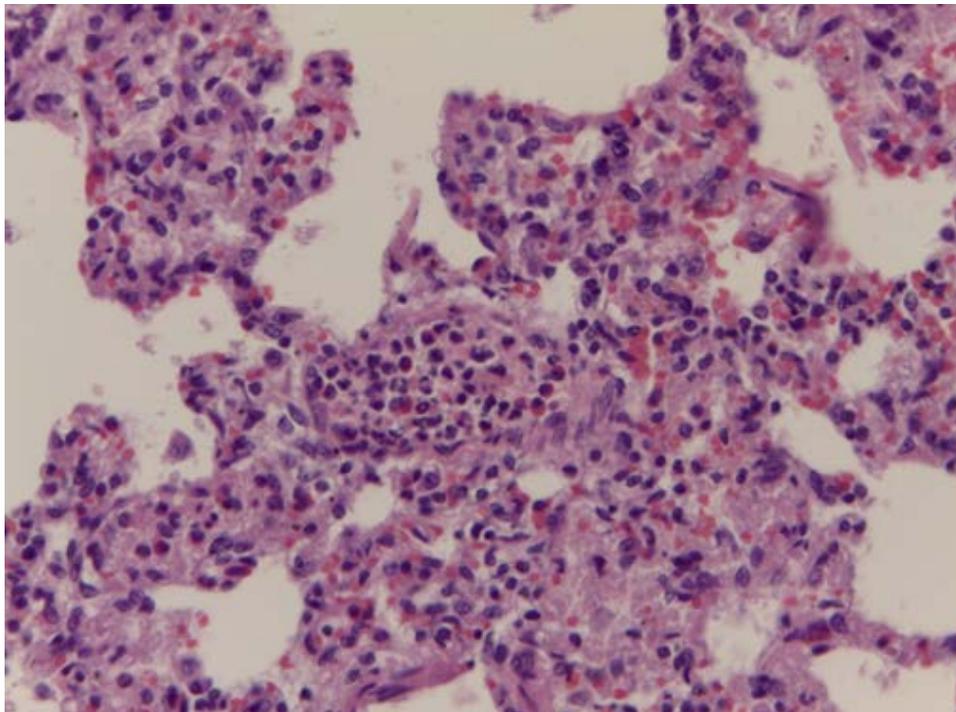


Imagen 21: Infiltrado de linfocitos y macrófagos en tabiques alveolares en uno de los animales inmunizados con la bacterina comercial. Tinción con hematoxilina-eosina (400×).

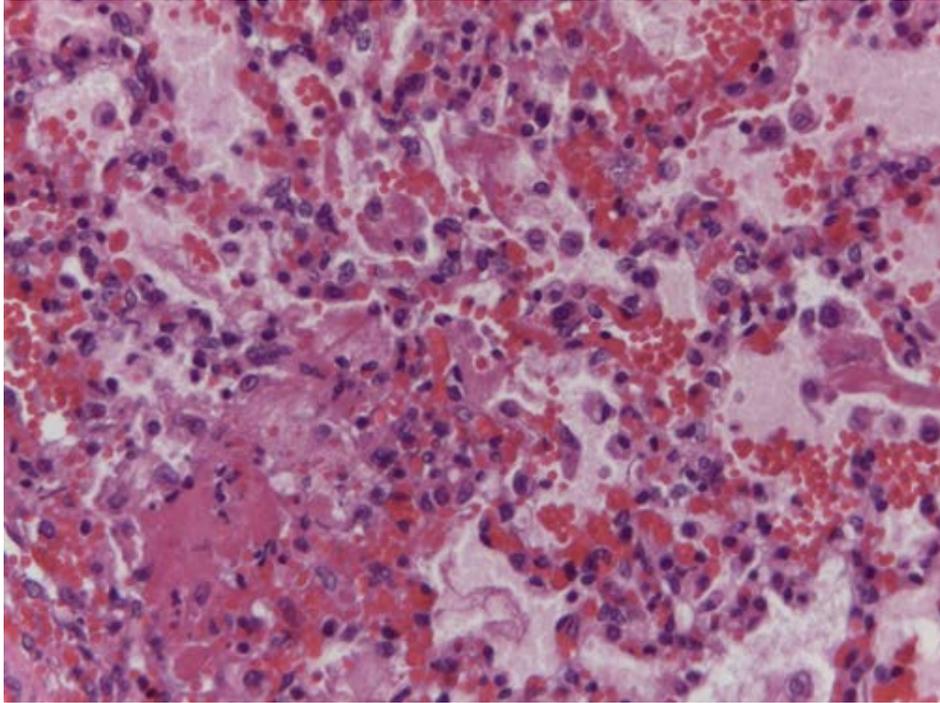


Imagen 22: Hemorragia y exudado de fibrina intraalveolar en un animal del grupo control NI. Tinción con hematoxilina-eosina (400×).

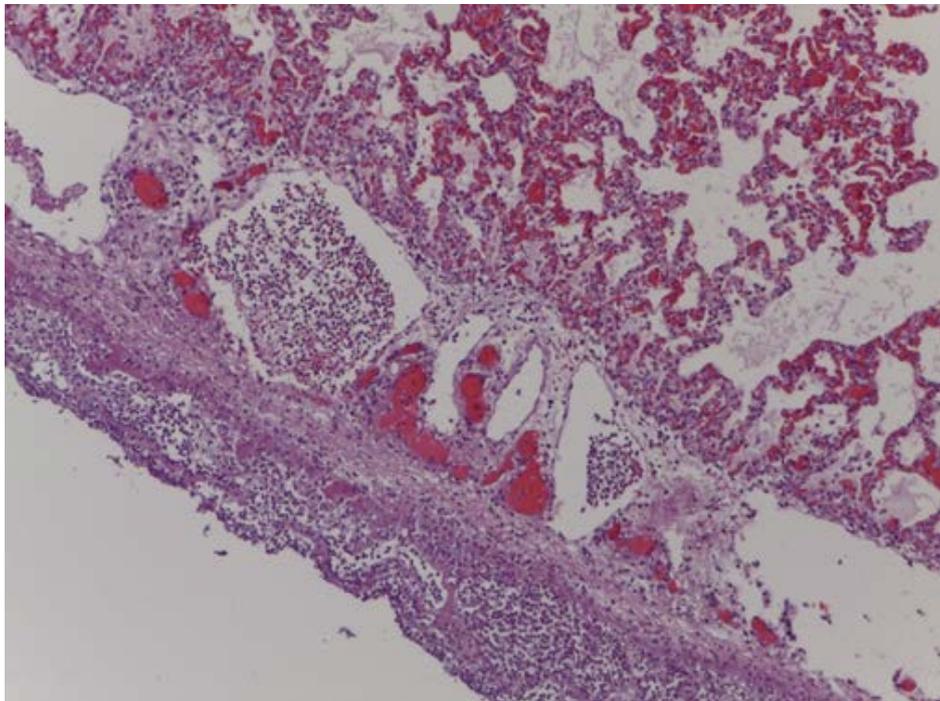


Imagen 23: Pleuritis fibrinosa y trombosis en un cerdo del grupo control NI. Tinción con hematoxilina-eosina (100×).

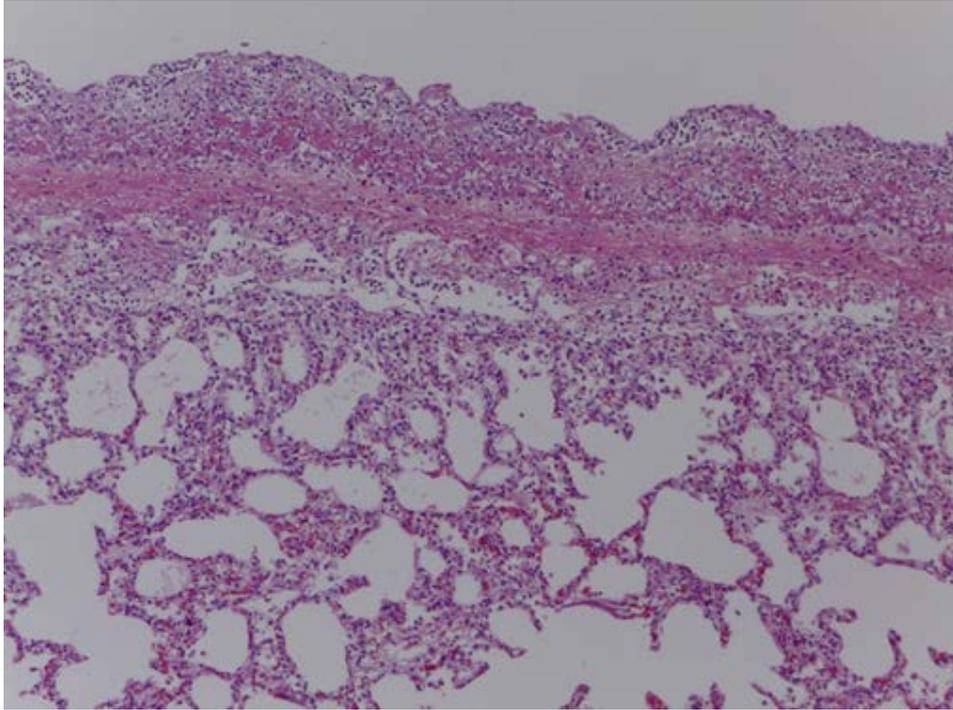


Imagen 24: Pleuritis fibrinoso-purulenta en un cerdo del grupo control NI. Tinción con hematoxilina-eosina (100×).

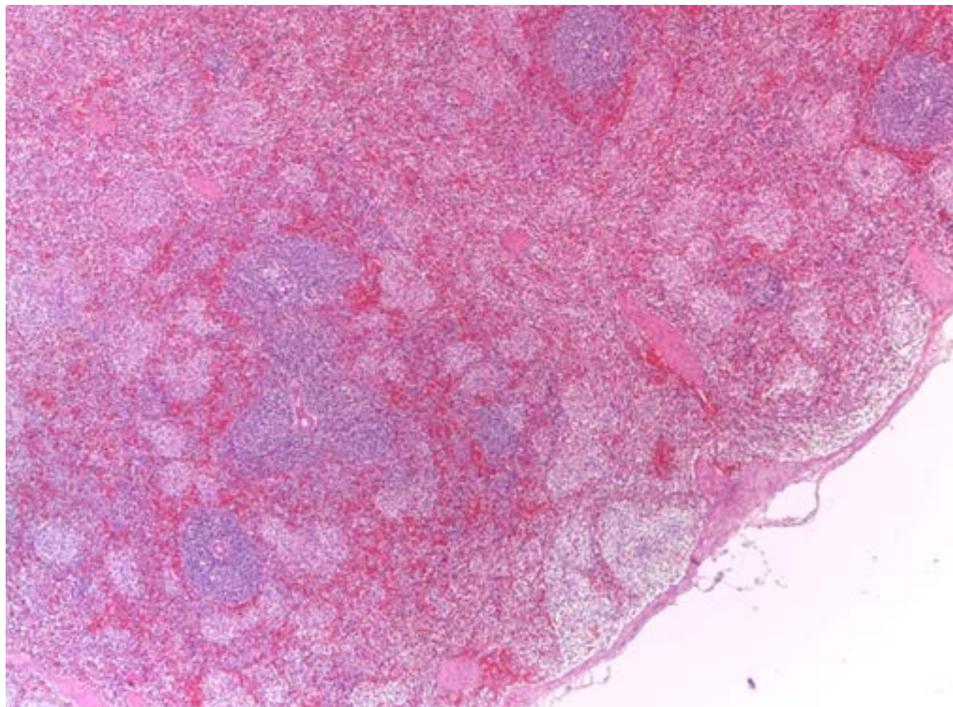


Imagen 25: Infiltrado histiocitario en el bazo de un animal del grupo control NI. Tinción con hematoxilina-eosina (40×).

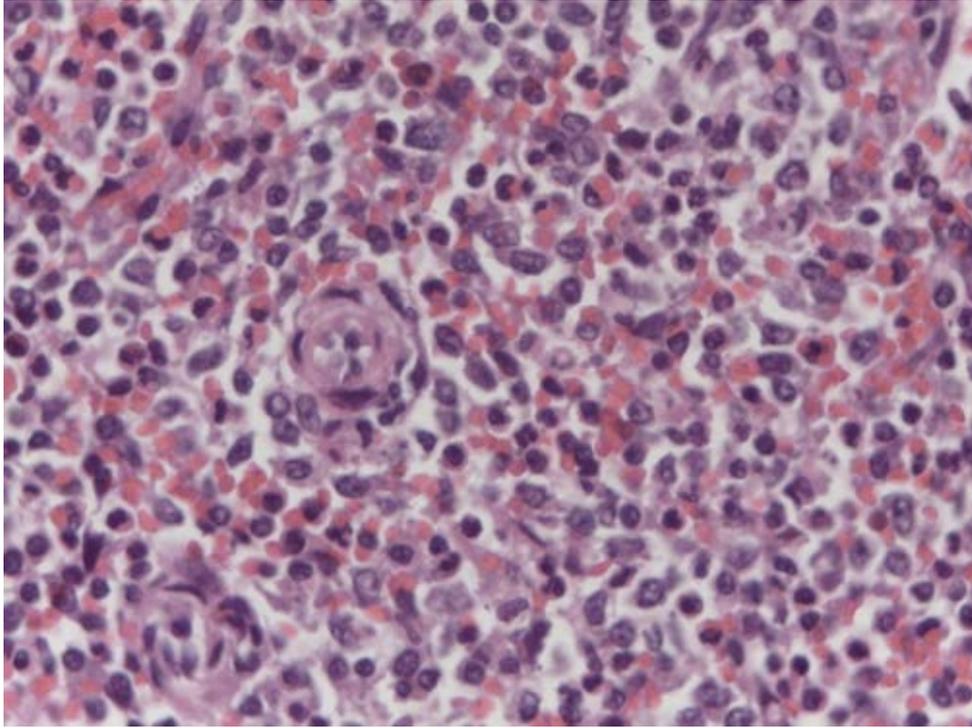


Imagen 26: Infiltrado de neutrófilos en el bazo de un cerdo inmunizado con las tres proteínas simultáneamente. Tinción con hematoxilina-eosina (630×).

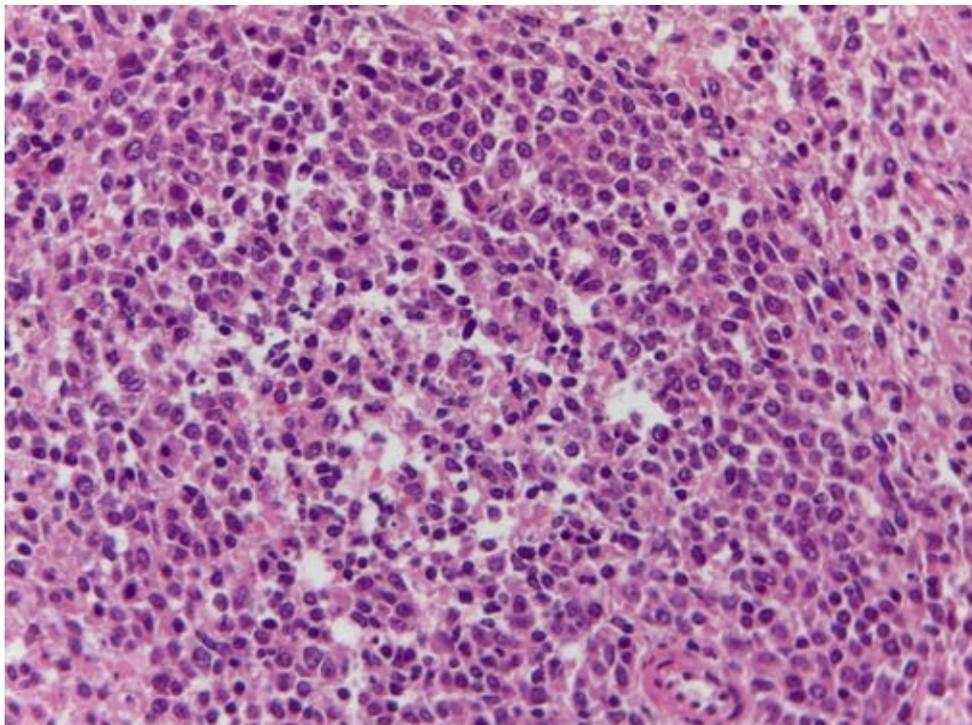


Imagen 27: Necrosis de linfocitos en el bazo de un cerdo inmunizado con las tres proteínas simultáneamente. Tinción con hematoxilina-eosina (400×).

4.1.4.1.4. Aislamiento de *Haemophilus parasuis* a partir de las muestras obtenidas en las necropsias

En la Tabla 22 se resumen los aislados de *H. parasuis*, obtenidos mediante cultivo y confirmación por PCR, a partir de los diferentes órganos muestreados durante la necropsia de cada uno de los cerdos del estudio. En los animales del grupo control no desafiado (ND) y en los animales inmunizados con la bacterina comercial no se detectó la bacteria en ninguna de las muestras. Por el contrario, en todos los cerdos del grupo control no inmunizado (NI) y de los grupos inmunizados con alguna de las proteínas o con las tres a la vez, se detectó la bacteria en al menos uno de los órganos muestreados diferentes del pulmón.

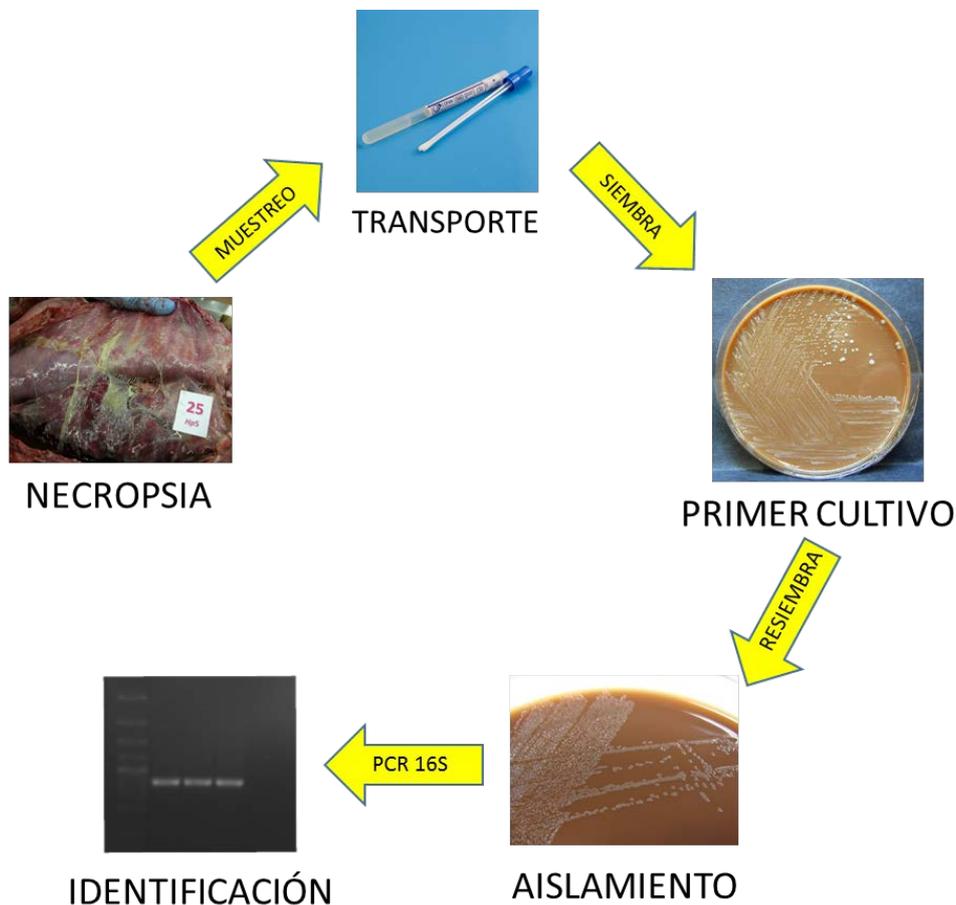


Figura 20: Esquema del procedimiento para aislamiento de *H. parasuis* en animales sospechosos de enfermedad de Glässer. En nuestro caso se recogieron muestras con hisopos y se sembraron directamente en agar chocolate. Tras su cultivo se seleccionaron colonias compatibles con *H. parasuis* para resembrar. Por último, los cultivos puros aislados fueron confirmados mediante PCR específica para la bacteria.

Grupo experimental	Animal	Cerebro	Pericardio	Pulmón	Hígado	Bazo	Carpo	Tarso
Control ND	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
Control NI	11	+	+	+	+	+	+	+
	12	-	-	+	+	-	+	+
	24	+	+	+	+	+	+	-
	25	-	+	+	-	-	+	+
	26	+	+	-	+	-	+	+
	27	+	+	-	+	-	+	+
	28	+	+	+	+	-	+	+
	29	-	+	+	+	-	+	-
	30	+	+	+	+	+	-	+
	31	+	+	-	+	-	-	-
	32	+	-	-	+	-	+	+
	33	-	-	+	+	+	+	+
34	-	+	+	-	-	+	-	
P2	7	+	+	-	-	-	-	+
	8	+	+	-	+	-	+	-
	9	+	+	+	+	-	-	+
	10	+	-	-	+	-	+	-
P5	13	+	-	+	-	-	-	-
	14	+	-	+	+	-	+	+
	15	+	-	-	-	-	-	-
	16	-	+	+	+	-	-	+
D15	3	+	+	-	-	-	+	+
	4	-	-	-	-	-	-	+
	5	+	+	+	+	+	+	+
	6	-	+	-	+	-	+	-
3 Proteínas	20	-	-	-	+	-	+	+
	21	+	+	-	-	-	+	+
	22	+	+	-	-	-	-	-
	23	+	-	-	+	+	+	+
Bacterina	17	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 22: Aislamiento confirmado por PCR de *H. parasuis* en los diferentes órganos muestreados durante la necropsia de los animales desafiados. **ND** significa grupo control no desafiado ni inmunizado; **NI** significa grupo control no inmunizado pero desafiado; **P2, P5, D15, 3 proteínas** o **bacterina** indica el grupo de inmunización al que pertenecía cada animal.

4.1.4.2. Estudio de la respuesta inmunitaria humoral en los diferentes grupos experimentales porcinos

Mediante la realización de los ELISAs indirectos se estudiaron los niveles en suero de las IgG totales específicas para las diferentes proteínas recombinantes y para la bacteria completa. Se utilizó como anticuerpos primarios los sueros de todos los animales en diferentes momentos del experimento. Dicho momentos fueron antes de la primera inmunización (con el que se compararon los demás instantes), antes de la segunda inmunización, antes del desafío, 24 horas después del desafío, nueve días y 14 días después (en estos tres último tiempos solo en caso de haber supervivencia).

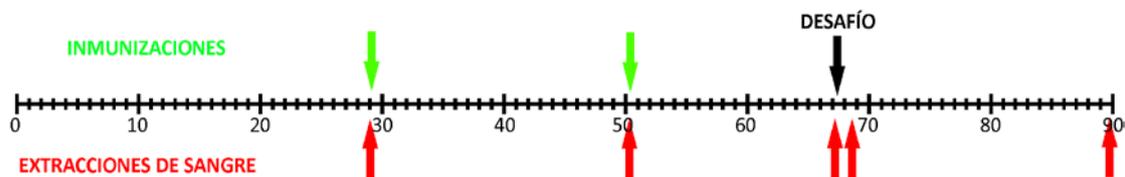


Figura 21: Cronograma de las inmunizaciones, extracciones de sangre y desafío en cerdos.

En los sueros procedentes de los animales del grupo control no inmunizado ni desafiado (Figura 22) y del grupo control no inmunizado pero si desafiado (Figura 23) no se apreciaron diferencias significativas al comparar la densidad óptica a 450 nm entre los sueros procedentes del momento previo a que los grupos restantes recibieran la primera inmunización con respecto a los sueros de los siguientes instantes, ni en las placas tapizadas con la bacteria entera ni en las tapizadas con cada una de las proteínas recombinantes.

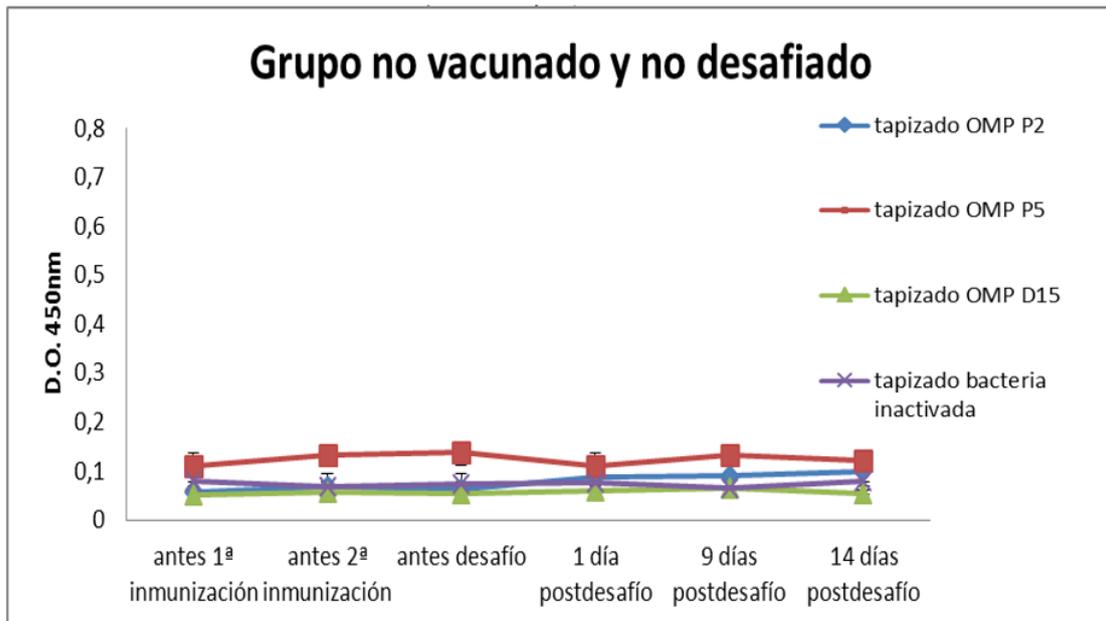


Figura 22: Valores de densidad óptica a 450 nm obtenidos al llevar a cabo ELISAs indirectos enfrentando los sueros del grupo de animales no inmunizados ni desafiados a placas tapizadas con cada una de las proteínas recombinantes o con la bacteria. La escala temporal se refiere a los eventos producidos en el conjunto de grupos experimentales, pero en este grupo en concreto no se realizó ninguna inmunización ni desafío, si bien se recogió sangre a la vez que en los demás grupos, que sí fueron desafiados y/o inmunizados. No se apreciaron diferencias significativas entre los valores obtenidos al comienzo y los demás instantes.

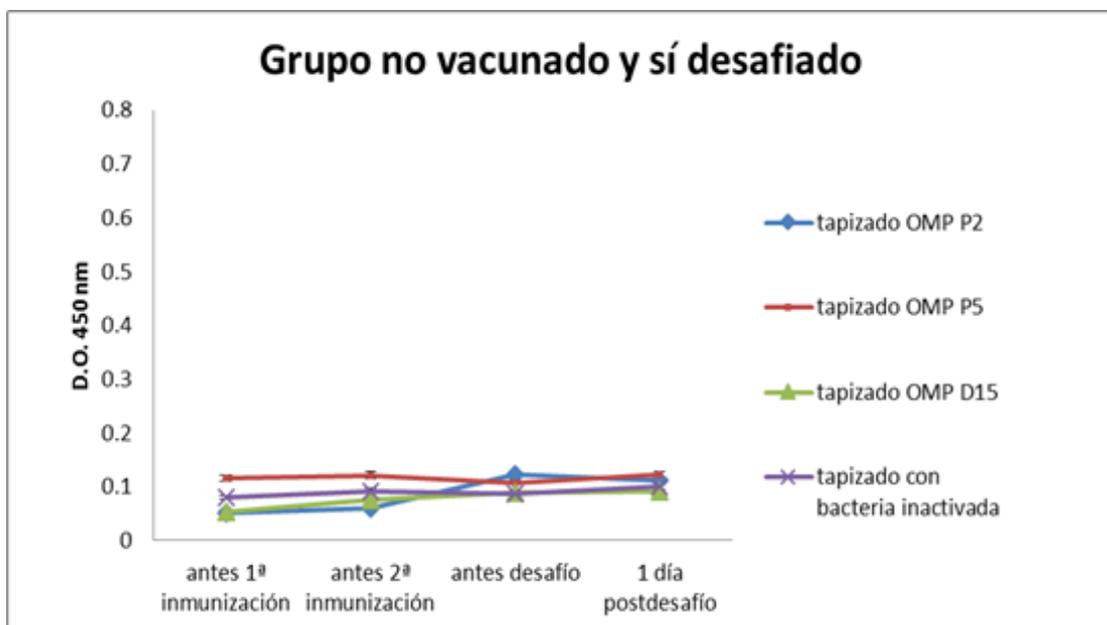


Figura 23: Valores de densidad óptica a 450 nm obtenidos al llevar a cabo ELISAs indirectos enfrentando los sueros del grupo de animales no inmunizados pero sí desafiados a placas tapizadas con cada una de las proteínas recombinantes o con la bacteria. Igual que en la anterior gráfica, la escala temporal se refiere a los eventos producidos en el conjunto de grupos experimentales. También en este grupo en concreto no se realizó ninguna inmunización pero se recogieron muestras sanguíneas. No se apreciaron diferencias significativas entre los valores obtenidos al comienzo y en los demás instantes.

Los sueros del grupo inmunizado con la bacterina comercial (Figura 24) mostraron un incremento significativo de la densidad óptica ($p < 0,01$) a partir de la primera inmunización, con respecto al instante previo a las inmunizaciones, en las placas tapizadas con la proteína P5. En el resto de tapizados (proteínas P2, D15 y bacteria completa), este incremento significativo de los niveles de anticuerpos no se observó hasta después de la segunda inmunización, manteniéndose en el resto de momentos del muestreo.

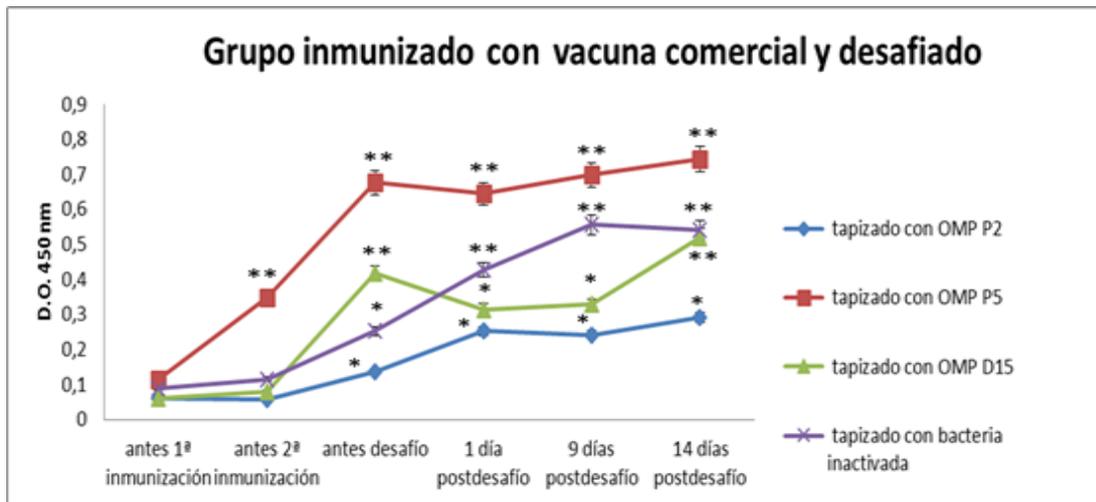


Figura 24: Valores de densidad óptica a 450 nm obtenidos al realizar ELISAs indirectos enfrentando los sueros del grupo de animales inmunizados con la bacterina comercial a placas tapizadas con cada una de las proteínas recombinantes o con la bacteria entera. Las diferencias significativas entre el instante correspondiente y el momento previo a la primera inmunización se indican con asteriscos: * implica un $p < 0,05$, ** indican un $p < 0,01$. El incremento significativo se produjo tras la primera inmunización en el caso de placas tapizadas con la proteína P5, y tras la segunda inmunización en placas tapizadas con las otras proteínas o con la bacteria entera.

Los sueros procedentes de los grupos de animales inmunizados con una única proteína recombinante mostraron un patrón muy similar, variando solo en la intensidad de la densidad óptica desarrollada. En placas tapizadas con la proteína recombinante correspondiente, con respecto al momento previo a la inmunización, se apreciaron incrementos significativos ($p < 0,01$) a partir de la primera vacunación, mientras que en las placas tapizadas con la bacteria el incremento de densidad óptica no se produjo hasta realizada la segunda inmunización y, aunque resultó significativo ($p < 0,05$), no resultó tan acusado como cuando se utilizaron placas tapizadas con la proteína correspondiente. En la Figura 25 se muestran los valores de densidad óptica para los sueros del grupo inmunizado con la proteína P2; en la 26, para los del grupo de la proteína P5 y en la 27, para los de la proteína D15.

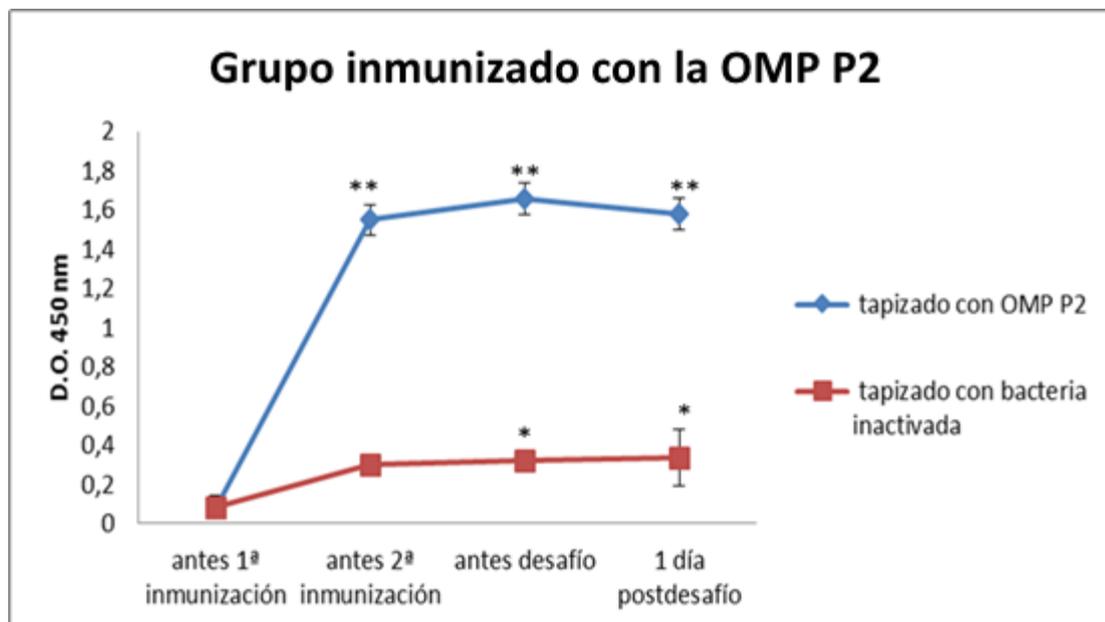


Figura 25: Valores de densidad óptica a 450 nm obtenidos al realizar ELISAs indirectos enfrentando los sueros del grupo de animales inmunizados con la P2 a placas tapizadas con la misma proteína o con la bacteria entera. Las diferencias significativas entre el instante correspondiente y el momento previo a la primera inmunización se indican con asteriscos: * implica un $p < 0,05$, ** indican un $p < 0,01$. En el caso del tapizado con la P2 se produjo un incremento significativo tras la primera inmunización. En el caso de tapizado con la bacteria, el incremento significativo se observó tras la segunda inmunización y resultó mucho menos intenso que en el tapizado con la proteína.

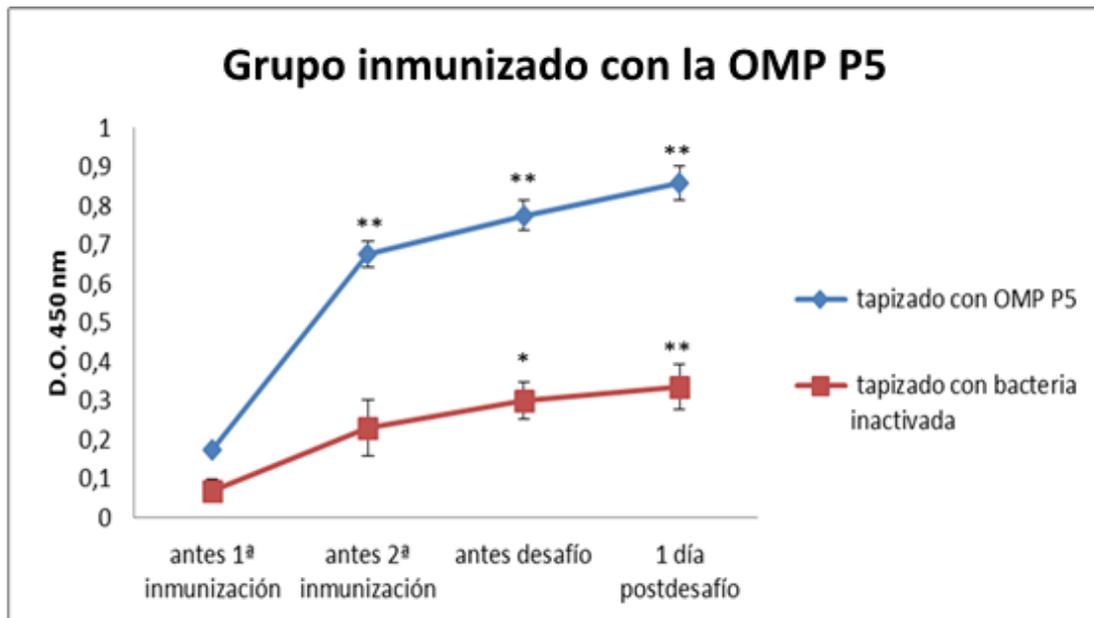


Figura 26: Valores de densidad óptica a 450 nm obtenidos al realizar ELISAs indirectos enfrentando los sueros del grupo de animales inmunizados con la P5 a placas tapizadas con la misma proteína o con la bacteria entera. Las diferencias significativas entre el instante correspondiente y el momento previo a la primera inmunización se indican con asteriscos: * implica un $p < 0,05$, ** indican un $p < 0,01$. En el caso del tapizado con la P5 se produjo un incremento significativo tras la primera inmunización, en el caso de tapizado con la bacteria, el incremento significativo se observó tras la segunda inmunización y resultó mucho menos intenso que en el tapizado con la proteína.

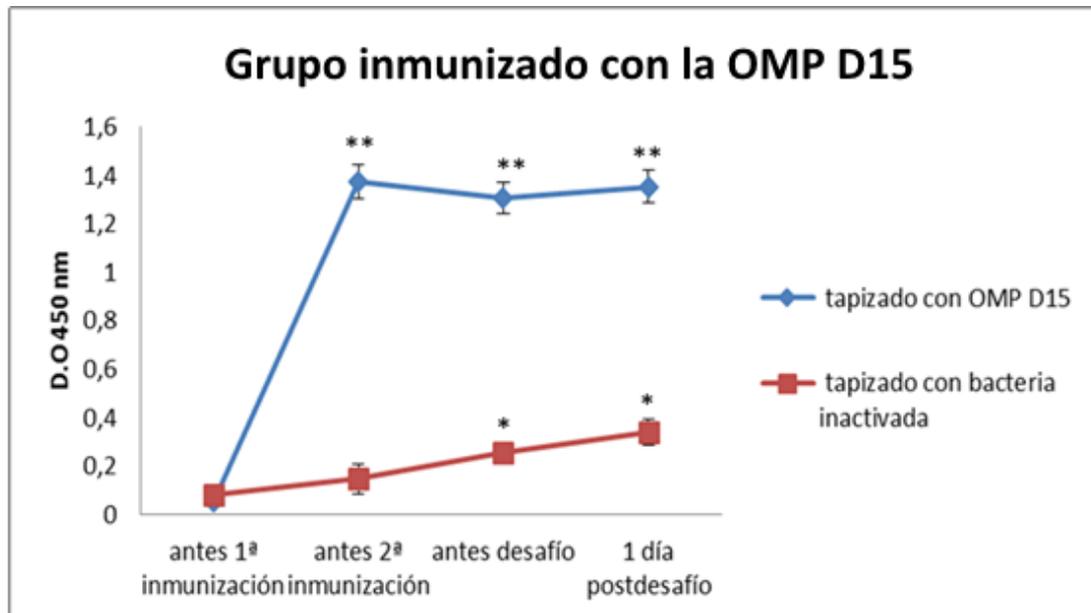


Figura 27: Valores de densidad óptica a 450 nm obtenidos al realizar ELISAs indirectos enfrentando los sueros del grupo de animales inmunizados con la D15 a placas tapizadas con la misma proteína o con la bacteria entera. Las diferencias significativas entre el instante correspondiente y el momento previo a la primera inmunización se indican con asteriscos: * implica un $p < 0,05$, ** indican un $p < 0,01$. En el caso del tapizado con la D15 se produjo un incremento significativo tras la primera inmunización, en el caso de tapizado con bacterina comercial, el incremento significativo se observó tras la segunda inmunización y resultó mucho menos intenso que en el tapizado con la proteína.

En el caso de grupo inmunizado con las tres proteínas recombinantes en conjunto (Figura 28), sus sueros mostraron a partir de la primera inmunización una densidad óptica significativamente más elevada ($p < 0,01$) en las placas tapizadas con cualquiera de las tres proteínas recombinantes. Cuando estos sueros fueron enfrentados a la bacteria entera, el incremento significativo de anticuerpos ($p < 0,05$) no se produjo hasta realizada la segunda inmunización y, lo mismo que sucedió con los grupos inmunizados con una sola proteína, no fue tan acusado como el observado en las ELISAs efectuadas con las placas tapizadas con alguna de las proteínas.

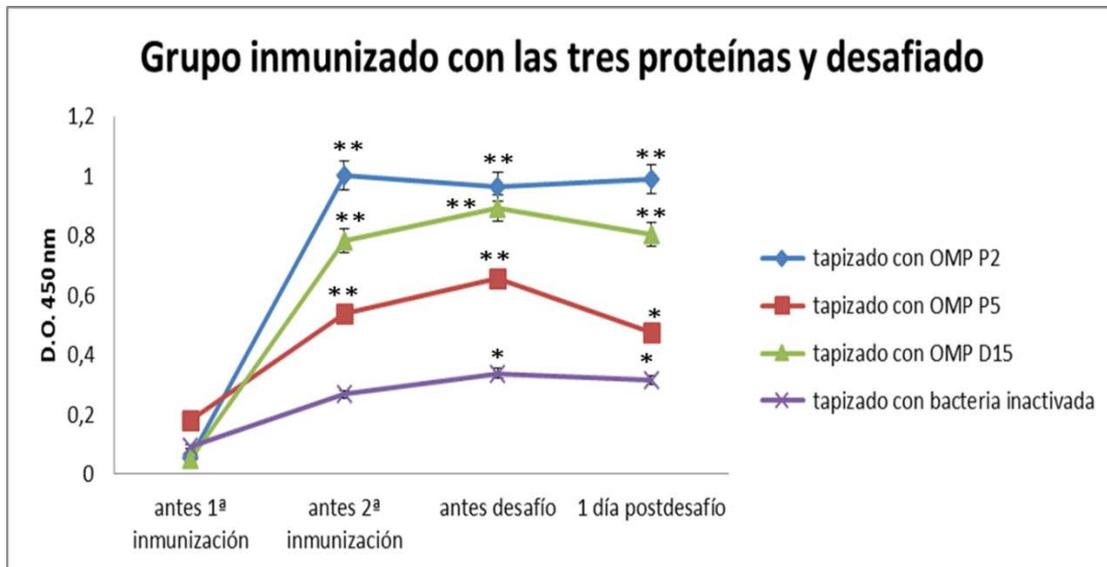


Figura 28: Valores de densidad óptica a 450 nm obtenidos al realizar ELISAs indirectos enfrentando los sueros del grupo de animales inmunizados con las tres proteínas en conjunto a placas tapizadas con cada una de ellas o con la bacteria entera. Las diferencias significativas entre el instante correspondiente y el momento previo a la primera inmunización se indican con asteriscos: * implica un $p < 0,05$, ** indican un $p < 0,01$. En el caso del tapizado con alguna de las proteínas se produjo un incremento significativo tras la primera inmunización, en el del tapizado con bacteria comercial, el incremento significativo se observó tras la segunda inmunización.

4.1.4.3. Estudio de la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta inmunitaria mediante PCR en tiempo real

En los genes en los que se estudió la expresión diferencial (CD14, CD163, interleuquinas 1, 6, y 8, factor de necrosis tumoral α , MCP-1, y TLRs 2, 4 y 5) no se observaron diferencias significativas entre el grupo control de los animales desafiados no inmunizados y el de los animales inmunizados con las tres proteínas. En la Tabla 23 se muestran los valores de p obtenidos.

GEN	PULMÓN	G. TRAQUEO BRONQUIAL	HÍGADO	BAZO
CD14	0,259	0,121	0,714	0,146
CD163	0,463	0,483	0,191	0,768
IL-1	0,735	0,639	0,06	0,317
IL-6	0,089	0,988	0,056	0,555
IL-8	0,051	0,192	0,261	0,425
MCP-1	0,282	0,464	0,149	0,135
TLR-2	0,354	0,092	0,194	0,056
TLR-4	0,608	0,057	0,439	0,117
TLR-5	0,468	0,068	0,219	0,864
TNF- α	0,145	0,914	0,57	0,127

Tabla 23: Estadística de la PCR en tiempo real. Se muestran valores de p obtenidos al comparar mediante una t de Student para muestras independientes la media de la expresión relativa de cada gen obtenida mediante el método $\Delta\Delta C_t$, entre los grupos control no inmunizado pero si desafiado y el grupo inmunizado con las tres proteínas.

4.2. ESTUDIO DE RECEPTORES RELACIONADOS CON LA SEPSIS SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN CERDOS INFECTADOS CON *Haemophilus parasuis*

4.2.1. Infección experimental

Para los estudios mediante citometría de flujo se emplearon 10 cerdos procedentes de la infección experimental, pertenecientes al grupo control no inmunizado. Después de 24 horas del desafío, la sintomatología resultante de la infección resultó muy evidente, con la aparición de disnea, hipertermia y postración. En ese momento, se procedió a la extracción de sangre para el aislamiento de PBMCs para, mediante citometría de flujo, comparar la intensidad de expresión de diferentes marcadores con la de PBMCs obtenidos de muestras tomadas inmediatamente antes de la infección en los mismos animales. En las primeras 48 horas fue necesario eutanasiar a estos animales para evitar sufrimiento. Una vez efectuadas las necropsias, en los 10 animales se consiguió aislar *H. parasuis* a partir de diferentes órganos, a mayores del pulmón (Tabla 24). Asimismo, todos estos cerdos mostraron presencia de exudado y de fibrina en alguna de las cavidades estudiadas (Tabla 25).

ÓRGANO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	POSITIVOS / TOTAL
MENINGES	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	7 / 10
PERICARDIO	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	8 / 10
PULMÓN	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	6 / 10
HÍGADO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	9 / 10
BAZO	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	2 / 10
CARPO	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	9 / 10
TARSO	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	7 / 10

Tabla 24: Resultados del aislamiento (cultivo en agar chocolate confirmado mediante PCR) de *H. parasuis* a partir de los diferentes órganos muestreados en los 10 animales.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CAVIDAD PERICÁRDICA	EXUDADO	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
	FIBRINA	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
CAVIDAD PLEURAL	EXUDADO	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
	FIBRINA	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
CAVIDAD ABDOMINAL	EXUDADO	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
	FIBRINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CARPO	EXUDADO	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	FIBRINA	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
TARSO	EXUDADO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FIBRINA	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Tabla 25: Presencia de exudado y fibrina en las cavidades corporales estudiadas en los 10 animales.

4.2.2. Establecimiento de regiones tamaño/complejidad

Al analizar los datos en cada muestra, primeramente se eliminaron los eventos “no sencillos”, mediante el diseño de una región diagonal sobre un *dot plot*, en el que se representaban los parámetros *forward-scattered-area* (FSC-A)/*forward-scattered-height* (FSC-H) (Figura 29 A). Sobre los eventos de esta región se delinearon otras dos regiones tamaño/complejidad para seleccionar monocitos o linfocitos, según el caso. Estas dos regiones fueron diseñadas sobre un *dot plot* en el que se representaban los parámetros *forward-scattered-area* (FSC-A)/*side-scattered-area* (SSC-A) (Figuras 29 B y C). En todos los marcajes estudiados se trabajó en la región FSC-A/SSC-A de monocitos, con excepción del estudio del Siglec-10, que se realizó en la región de linfocitos.

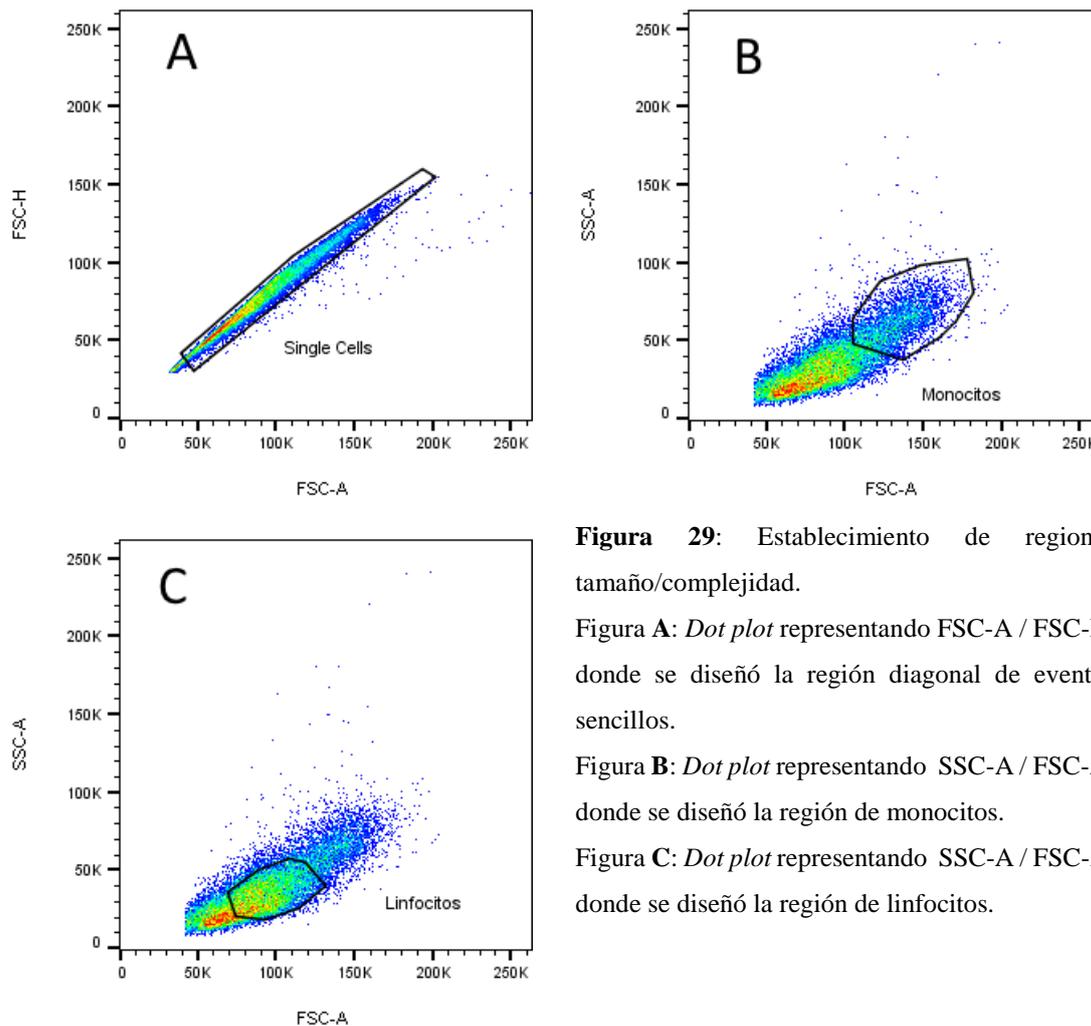


Figura 29: Establecimiento de regiones tamaño/complejidad.

Figura **A**: *Dot plot* representando FSC-A / FSC-H, donde se diseñó la región diagonal de eventos sencillos.

Figura **B**: *Dot plot* representando SSC-A / FSC-A, donde se diseñó la región de monocitos.

Figura **C**: *Dot plot* representando SSC-A / FSC-A, donde se diseñó la región de linfocitos.

4.2.3. Dobles marcajes con anti-CD172a

El CD172a, también conocido como *Signal Regulatory Protein α* (SIRPα), es un marcador presente en los granulocitos, monocitos y células derivadas de éstos últimos. Debido a que nuestras muestras fueron PBMCs (fracción en la cual solo debería haber linfocitos y monocitos), se utilizó el marcador CD172a en dobles marcajes de manera que, en la región SSC-A/FSC-A de monocitos, al seleccionar los eventos con expresión elevada de CD172a (CD172a^{hi}), se permitiera el estudio de la expresión de los diferentes marcadores sobre monocitos (Figura 30 A). Esto se utilizó para estudiar la expresión de los TLR-2, TLR-4, Siglec-1, Siglec-3, Siglec-5 y CD163 sobre los monocitos. Por contra, en el caso del Siglec-10, debido a que se encuentra descrito en los linfocitos B, el estudio de sus niveles de expresión se realizó sobre eventos de la región SSC-A/FSC-A de linfocitos que además fueran CD172a⁻ (Figura 30 B). Los animales utilizados para estos dobles marcajes fueron tres, en los que se estudió la manera en que se modificaban los

niveles de expresión de los diferentes marcadores cuando los animales estaban padeciendo un cuadro séptico.

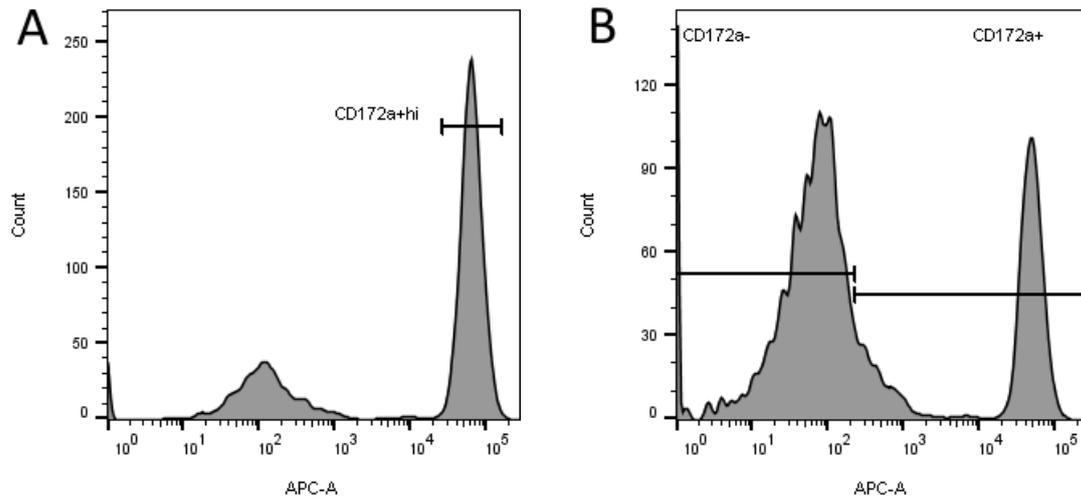


Figura 30: Selección de eventos CD172a^{hi} sobre región de monocitos y de eventos CD172⁻ sobre región de linfocitos.

A: Histograma donde se representa la expresión de CD172a en la región SSC-A / FSC-A de monocitos previamente establecida. Se selecciona una nueva región mediante el acotamiento del pico de alta expresión de CD172a (CD172a^{hi}). En los eventos de esta nueva región es donde se estudió la expresión de TLR-2, TLR-4, Siglec-1, Siglec-3, Siglec-5 y CD163.

B: Histograma donde se representa la expresión de CD172a en la región SSC-A / FSC-A de linfocitos previamente establecida. Se selecciona una nueva región negativa para la expresión de CD172a (CD172a⁻), la cual se estableció previamente con el tubo negativo para anti-CD172a. En los eventos de esta nueva región es donde se estudió la expresión de Siglec-10.

Los perfiles de expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, Siglec-3 y Siglec-5 dieron origen a un pico unimodal y, además, la práctica totalidad de CD172a^{hi} resultaron positivos para estos cuatro marcadores (Figura 31). Por ello, para medir su intensidad de expresión, se optó por calcular la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada pico y normalizarla con la IMF del pico negativo de expresión en el tubo *minus one* para el marcador correspondiente, en el mismo animal y momento (Figura 32). Para la normalización de la IMF se empleó el cálculo de la siguiente *ratio*:

$$\text{Intensidad media de fluorescencia normalizada (IMFN)} = \frac{\text{IMF del pico positivo del tubo doble positivo}}{\text{IMF del pico negativo del tubo } \textit{minus one} \textit{ correspondiente}}$$

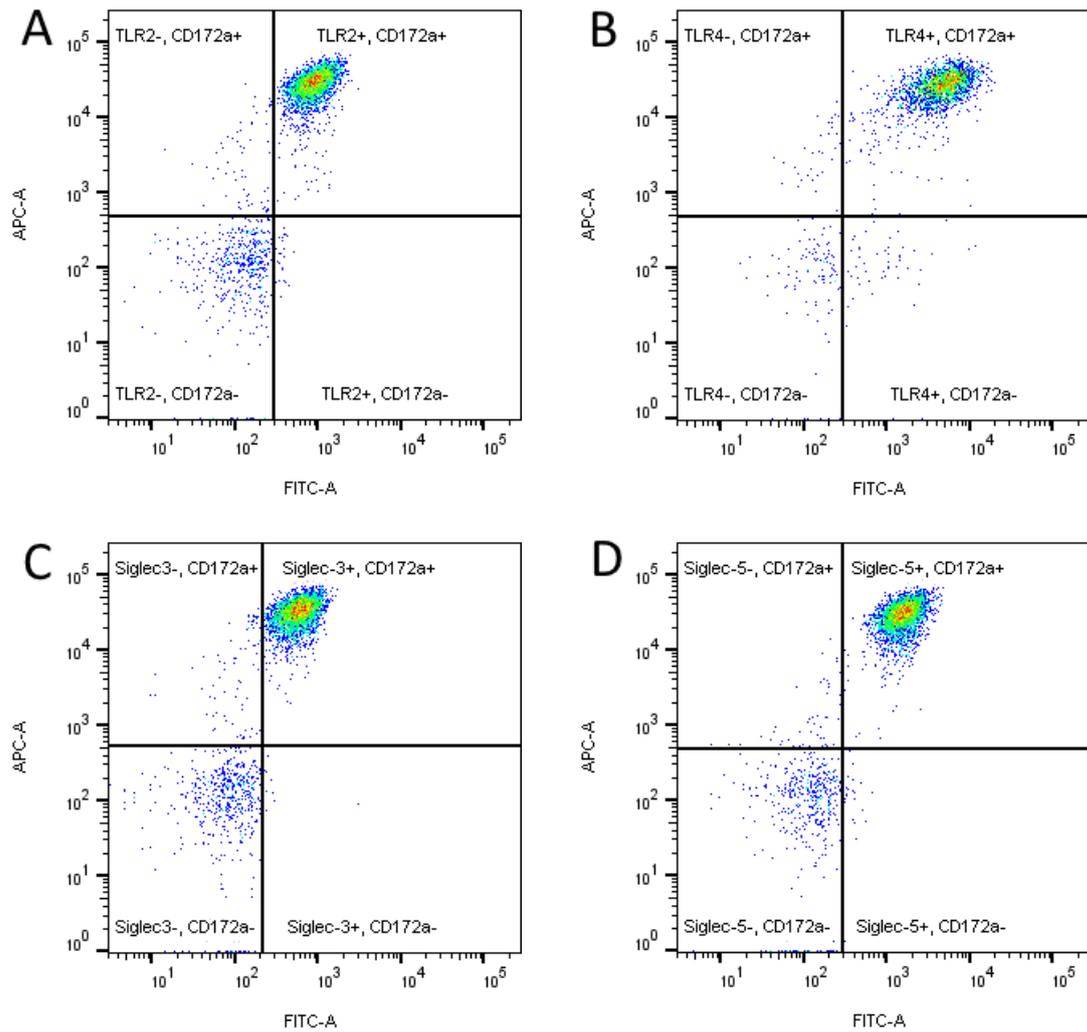


Figura 31: *Dot plots* representando la expresión de CD172a frente a la expresión de TLR-2 (A), TLR-4 (B), Siglec-3 (C) y Siglec-5 (D) en la región SSC-A / FSC-A de “monocitos”. Se puede observar cómo la práctica totalidad de las CD172a^{hi} resultaron positivas para TLR-2, TLR-4, Siglec-3 y Siglec-5. Esto fue observado en los tres animales, tanto antes como después de la infección.

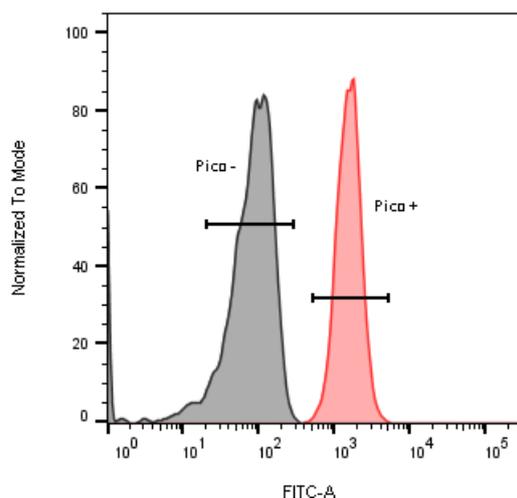


Figura 32: Establecimientos de picos para cálculo de IFMN. Se muestra la superposición entre histograma del tubo positivo para un marcador (rosa) y el histograma de su *minus one* correspondiente (gris). Ambos proceden del mismo animal y momento. El pico rosa se corresponde con la distribución de los eventos positivos para el marcador. El pico gris se corresponde con la señal negativa establecida en el *minus one*. Acotando el pico rosa, se calcula la IMF para el marcador. Acotando el pico gris se calcula la IMF de la señal negativa, que luego se utilizará para calcular la IMFN mediante el cociente IFM positivo / IFM negativo.

Los eventos CD172a⁻ de una región SSC/FSC propia de “linfocitos”, o CD172a⁺ de bajo nivel (CD172^{+low}), resultaron negativos prácticamente en su totalidad para TLR-2, Siglec-3 y Siglec-5 en los tres animales, tanto antes como después del desafío. En el caso del TLR-4 se observó que tanto en la subpoblación CD172a⁻, cómo en la CD172^{+low} aparecía un pequeño porcentaje positivo para dicho TLR.

Por otro lado, en los eventos CD172a^{+hi} dentro de la zona SSC-A / FSC-A propia de monocitos, se observó que coexistían poblaciones negativas y positivas para la expresión de CD163 y Siglec-1. De la misma forma, en eventos CD172⁻ de una región propia de linfocitos se observaron poblaciones Siglec-10⁺ y Siglec-10⁻ (Figura 33). Para establecer el umbral a partir del cual se consideraba positiva la expresión de estos marcadores (CD163, Siglec-1 y Siglec-10), se utilizó el tubo *minus one* correspondiente (Figura 34). En estos casos, el cálculo de la IMF de cada marcador se realizó únicamente en las poblaciones positivas para él (Figura 33).

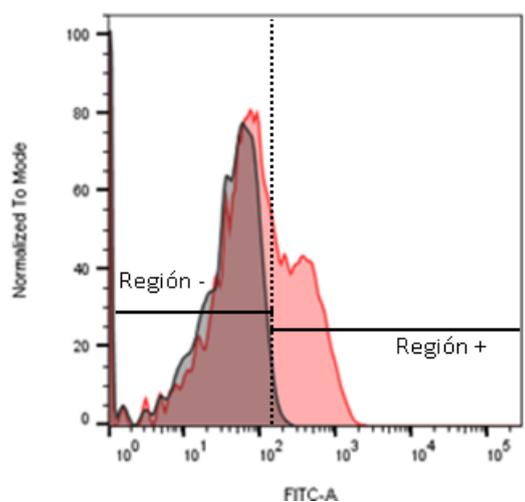
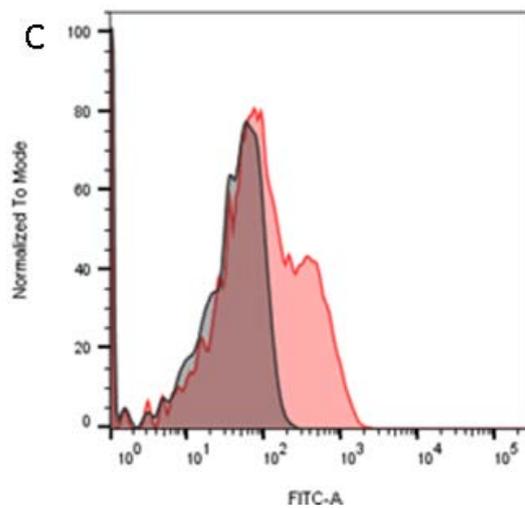
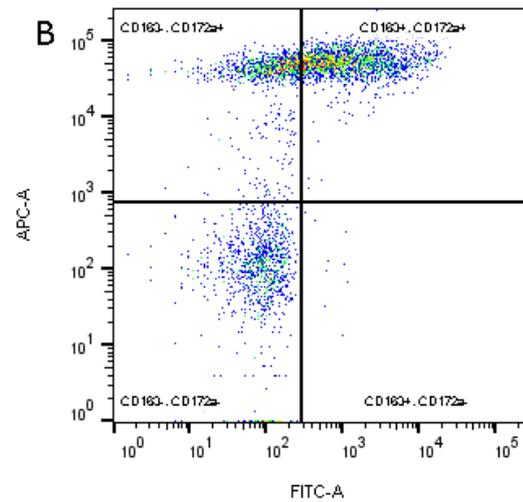
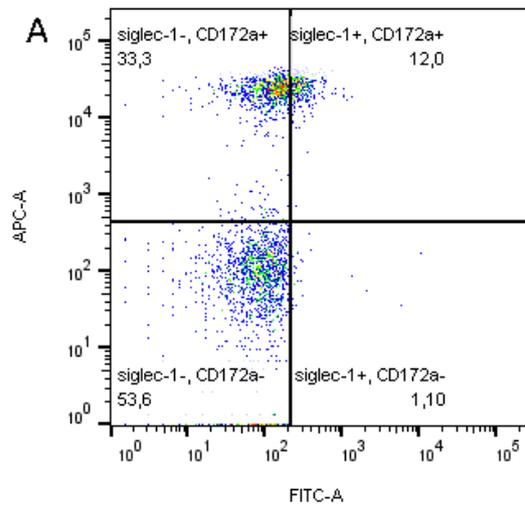


Figura 33: Las imágenes superiores corresponden a *dot plots* donde se representa la expresión de CD172a frente a la expresión de Siglec-1 (A) y CD163 (B) en la región SSC-A / FSC-A de monocitos. La imagen de la izquierda (C) corresponde a una superposición de los histogramas de la expresión de Siglec-10 en eventos CD172a⁻ de la región SSC-A / FSC-A de linfocitos. El pico gris se corresponde con la señal negativa establecida en el *minus one* para Siglec-10. El pico bimodal rosa se corresponde con la señal del tubo con anticuerpo anti-Siglec-10. Como se puede observar hay una población positiva y otra negativa para dicho marcador. Esta observación es representativa de los 3 animales, tanto antes como después de la infección.

Figura 34: Establecimiento de regiones positivas y negativas para medir la IMF en aquellos marcadores que, en los eventos a estudiar, contaban tanto con una subpoblación positiva como con una negativa. En la imagen se representa una superposición del histograma de la expresión de un marcador en el tubo positivo (rosa) con el histograma del tubo *minus one* correspondiente (gris). A partir del pico negativo, se estableció el umbral a partir del cual considerar positivos los eventos.

4.2.3.1. Resultados de TLR-2

Estudiando lo ocurrido en cada uno de los tres animales, se apreció que en todos ellos, después de la infección experimental y del desarrollo de la sepsis, se producía un incremento de la IMFN de TLR-2 en los monocitos circulantes (Figura 35), los cuales, como se describe más arriba, fueron definidos como CD172a^{hi} presentes en una región SSC-A/FSC-A propia de monocitos. Al comparar los valores de IMFN de los animales inmediatamente antes del desafío con los de los mismos cerdo al cabo de 24 horas, se observó que estos últimos resultaban significativamente más elevados ($p = 0,016$).

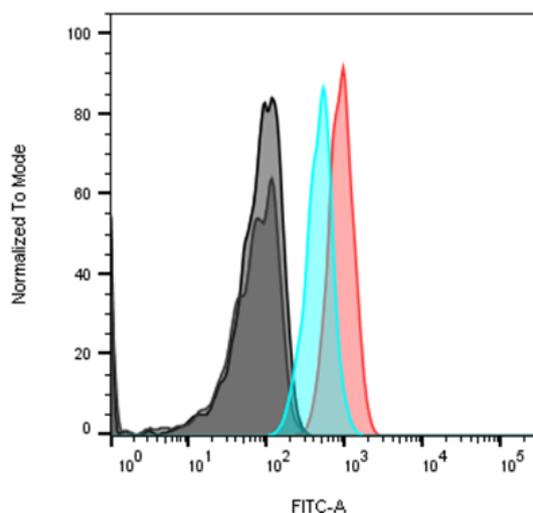


Figura 35: Expresión de TLR-2 en eventos CD172a^{hi}. Se muestra la superposición entre histogramas de intensidad de fluorescencia en monocitos del tubo *minus one* para TLR-2 antes de la infección (gris claro), del *minus one* para TLR-2 tras la infección (gris oscuro), del positivo para TLR-2 antes de la infección (azul) y del positivo para TLR-2 tras la infección (rosa). Como se puede apreciar, la señal negativa antes de la infección (pico gris claro) es prácticamente idéntica a la de después de la infección (pico gris oscuro), en cambio, la intensidad de fluorescencia de TLR-2 tras la infección (pico rosa) es claramente más intensa que la intensidad de fluorescencia de TLR-2 previa al desafío (pico azul). Los cuatro histogramas proceden del mismo animal. Lo observado en esta superposición es representativo de los tres animales.

4.2.3.2. Resultados de Siglec-3

Al igual que lo observado para TLR-2, se apreció que en los tres animales estudiados se producía un incremento de la IMFN de Siglec-3 en monocitos circulantes tras la infección (Figura 36). En este caso, como se desprende de la observación de los histogramas, el incremento no resultó tan pronunciado como el observado para TLR-2, pero aun así también resultó estadísticamente significativo ($p = 0,039$).

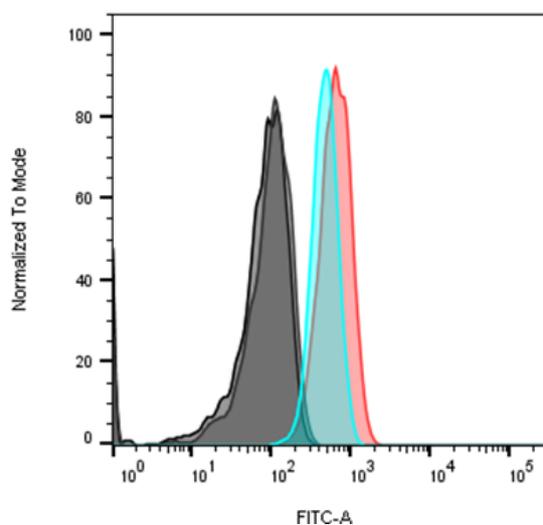


Figura 36: Expresión de Siglec-3 en eventos CD172a^{hi}. Se muestra la superposición entre histogramas de intensidad de fluorescencia en monocitos del tubo *minus one* para Siglec-3 antes de la infección (gris claro), del *minus one* para Siglec-3 tras la infección (gris oscuro), del positivo para Siglec-3 antes de la infección (azul) y del positivo para Siglec-3 tras la infección (rosa). La señal negativa antes de la infección (pico gris claro) es muy similar a la de después de la infección (pico gris oscuro). La intensidad de fluorescencia de Siglec-3 tras la infección (pico rosa) es moderadamente más intensa que la intensidad de fluorescencia de Siglec-3 previa al desafío (pico azul). Los cuatro histogramas proceden del mismo animal. Lo observado en esta superposición es representativo de los tres animales.

4.2.3.3. Resultados de CD163

Observando las superposiciones de los histogramas entre antes y después del desafío, se pudo apreciar un incremento de la IMF del CD163 en los monocitos tras la infección (Figura 37). Los valores de la IMF de los eventos CD163⁺ aumentaron después de la infección en los tres animales, sobre todo en dos de ellos. Sin embargo, este incremento no resultó estadísticamente significativo ($p = 0,072$). Con respecto a la proporción del CD163⁺ sobre el CD172a^{hi}, se apreció un escueto descenso después de la infección en dos de los animales y un poco más acusado en el cerdo restante. Este descenso de eventos positivos para el CD163 tampoco resultó estadísticamente significativo ($p = 0,174$).

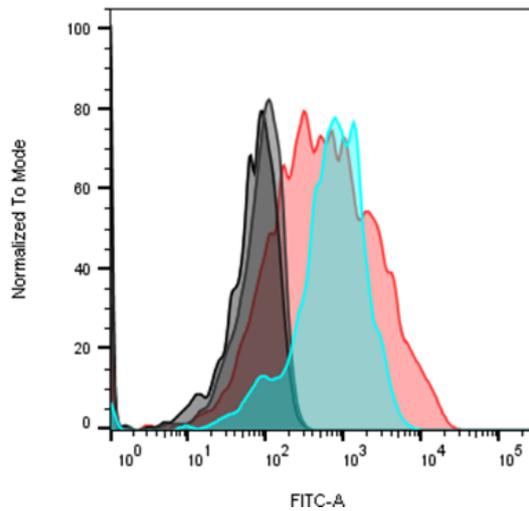


Figura 37: Expresión de CD163 en eventos CD172a^{hi}. Se muestra la superposición entre histogramas de intensidad de fluorescencia en monocitos del tubo *minus one* para CD163 antes de la infección (gris claro), del *minus one* para CD163 tras la infección (gris oscuro), del positivo para CD163 antes de la infección (azul) y del positivo para CD163 tras la infección (rosa). Cada señal negativa del *minus one* fue utilizada para establecer el umbral a partir del cual considerar positiva la señal del tubo positivo para CD163 correspondiente. Esta superposición de histogramas se corresponde con el animal donde fue menor el incremento de IMF de CD163 tras la infección.

4.2.3.4. Resultados de TLR-4

Al examinar los valores de la IFMN de TLR-4, se observó que en dos animales descendía y en el restante se incrementaba muy ligeramente. Al observar la superposición de los histogramas se aprecia una disminución en la IMFN en dos de los cerdos, mientras que en el restante no parecía modificarse (Figura 38). En cualquier caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos momentos ($p = 0,427$). Con respecto al pequeño porcentaje de eventos CD172a⁻ y CD172a^{hi} que resultaron positivos para el TLR-4, no pudo establecerse una relación entre antes y después del desafío, ni en cuanto al porcentaje de eventos positivos ni respecto a la intensidad de expresión.

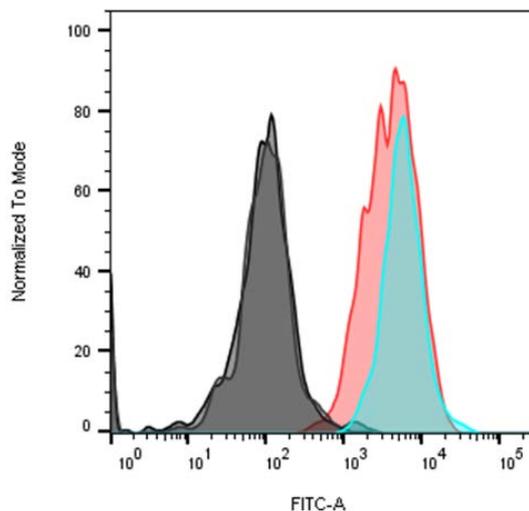


Figura 38: Expresión de TLR-4 en eventos CD172a^{hi}. Se muestra la superposición entre histogramas de intensidad de fluorescencia en monocitos del tubo *minus one* para TLR-4 antes de la infección (gris claro), del *minus one* para TLR-4 tras la infección (gris oscuro), del positivo para TLR-4 antes de la infección (azul) y del positivo para TLR-4 tras la infección (rosa). Los cuatro histogramas proceden del mismo animal. La señal negativa antes de la infección (pico gris claro) es muy similar a la de después de la infección (pico gris oscuro). Se aprecia que el pico de intensidad de fluorescencia post-desafío (pico rosa) tiende a ser menos intenso que en el momento pre-desafío (azul). El animal representado es aquel en el que se apreció una mayor disminución de IMFN tras el desafío.

4.2.3.5. Resultados de Siglec-5

En el caso de la IMFN del Siglec-5, se observó que se incrementaba en dos animales después de la infección, mientras que en el restante disminuía ligeramente (Figura 39). Estadísticamente, como era de esperar, no se apreciaron diferencias significativas entre ambos momentos ($p = 0,26$). Por lo tanto, con este doble marcaje no se pudo establecer una tendencia clara en la expresión del Siglec-5 una vez establecida la infección.

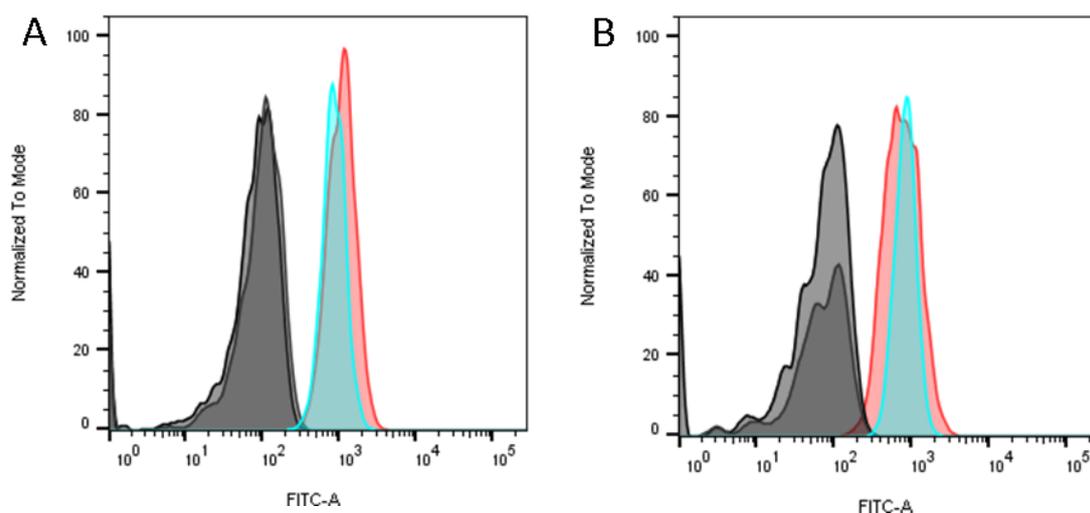


Figura 39: Expresión de Siglec-5 en eventos CD172a^{hi}. Se muestra la superposición entre histogramas de intensidad de fluorescencia en monocitos del tubo *minus one* para Siglec-5 antes de la infección (gris claro), del *minus one* para Siglec-5 tras la infección (gris oscuro), del positivo para Siglec-5 antes de la infección (azul) y del positivo para Siglec-5 tras la infección (rosa). La figura A corresponde a uno de los animales donde se apreció un ligero incremento tras la infección. La figura B corresponde al animal donde la expresión de Siglec-5 no se vio afectada.

4.2.3.6. Resultados de Siglec-1

Igual que lo ocurrido en el caso anterior, los resultados observados en el Siglec-1 con este doble marcaje no se pueden considerar concluyentes, ya que nos encontramos con un animal que incrementaba marcadamente su IMF una vez establecida la infección, otro en el que la IMF se vio débilmente incrementada y un tercero en el que la IMF decreció. Obviamente, las diferencias observadas para la IMF antes y después no resultaron significativas ($p = 0,447$). En el caso del porcentaje de los monocitos Siglec-1⁺ se apreció que en los tres animales se producía un descenso de esta subpoblación ocurrida la infección; sin embargo, a pesar de tratarse de un decrecimiento pronunciado, las diferencias entre ambos momentos no resultaron significativas debido, seguramente, al pequeño tamaño de la muestra ($p = 0,104$).

4.2.3.7. Resultados de Siglec-10

Observando los histogramas de la expresión de Siglec-10 en los eventos CD172a⁻ de una región SSC-A/FSC-A propia de linfocitos, no parece que pueda deducirse un incremento de su intensidad de fluorescencia (Figura 40). Al reparar en los valores de IMF, se observó un ligero aumento tras el desafío en dos animales, mientras que el tercero prácticamente no vio modificados sus valores. Como cabía esperar, los cambios no resultaron estadísticamente significativos ($p = 0,156$). Las proporciones de linfocitos Siglec-10⁺ evolucionaron de diferente forma en cada animal después de la infección, disminuyendo ligeramente en uno de ellos y aumentando en los otros dos, aunque con diferente intensidad. Con respecto a los monocitos (eventos CD172^{hi} en la región SSC/FSC de monocitos), la expresión del Siglec-10 fue siempre negativa en los tres animales estudiados, tanto antes como después del desafío.

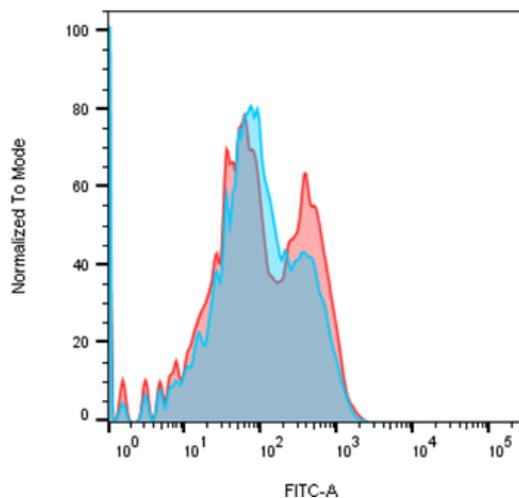


Figura 40: Expresión de Siglec-10 en eventos CD172a⁻. Se muestra la superposición de histogramas de las intensidades de fluorescencia de Siglec-10 antes de la infección (azul) y tras 24 horas del desafío (rosa). Los picos de la izquierda se corresponden con los eventos Siglec-10⁻ mientras que los picos más pequeños de la derecha se corresponden con los eventos Siglec-10⁺.

4.2.4. Dobles marcajes con anti-CD163

Tras lo observado con el doble marcaje con CD172a, se optó por utilizar los animales restantes para realizar dobles marcajes con CD163, de manera que se pudiera enfrentar la expresión de los anteriores marcadores de monocitos (TLR-2, TLR-4, Siglec-1, Siglec3 y Siglec-5) con la expresión CD163. Esto permitió, por un lado, confirmar (para TLR-2, TLR-4 y Siglec-3) o aclarar (para Siglec-1, Siglec-5 y CD163) las tendencias observadas para los monocitos en los anteriores dobles marcajes con CD172a y, por otro, ahondar en las tendencias de estos marcadores en las subpoblaciones de monocitos CD163⁺ y CD163⁻.

Como todos los marcadores que fueron estudiados eran propios de los monocitos, se estableció una región SSC-A/FSC-A propia de dichas células. Valiéndonos de los tubos *minus one* para el CD163, se establecieron las regiones CD163⁺ y CD163⁻ (como se explicó en la Figura 34) y, seleccionando ambas poblaciones, se estudiaron los cambios en intensidad de expresión para cada marcador tras la infección, en cada una de ellas. Nuevamente TLR-2, TLR-4, Siglec-3 y Siglec-5 dieron lugar a picos unimodales, por lo que su IMF fue normalizada, como se explicó anteriormente, en el apartado de los dobles marcajes con anti-CD172a. En el caso de Siglec-1, nos encontramos con subpoblaciones positivas y negativas, por lo que el cálculo de su IMF se estimó teniendo en cuenta solo los eventos Siglec-1⁺.

Con estos dobles marcajes también se volvió a estudiar la expresión de CD163 sobre los monocitos, definidos en este caso como eventos TLR-2⁺ en la región SSC/FSC propia de monocitos, gracias a que se observó que todos los eventos CD163 eran también TLR-2⁺.

4.2.4.1. Resultados de TLR-2

Tras el desafío, los seis animales estudiados sufrieron un incremento considerable de su IFMN para TLR-2 en los monocitos CD163⁺ (Imagen 41 izquierda). Comparando las IFMN antes y después, nos encontramos que una vez comenzada la infección, la IFMN resultaba significativamente más elevada ($p < 0,001$). En el caso de los eventos CD163⁻ también se apreció un incremento de la IFMN de TLR-2 en los seis animales, pero resultó mucho menos intenso (Imagen 41 derecha), si bien la IFMN también resultó significativamente más elevada después de la infección ($p = 0,003$).

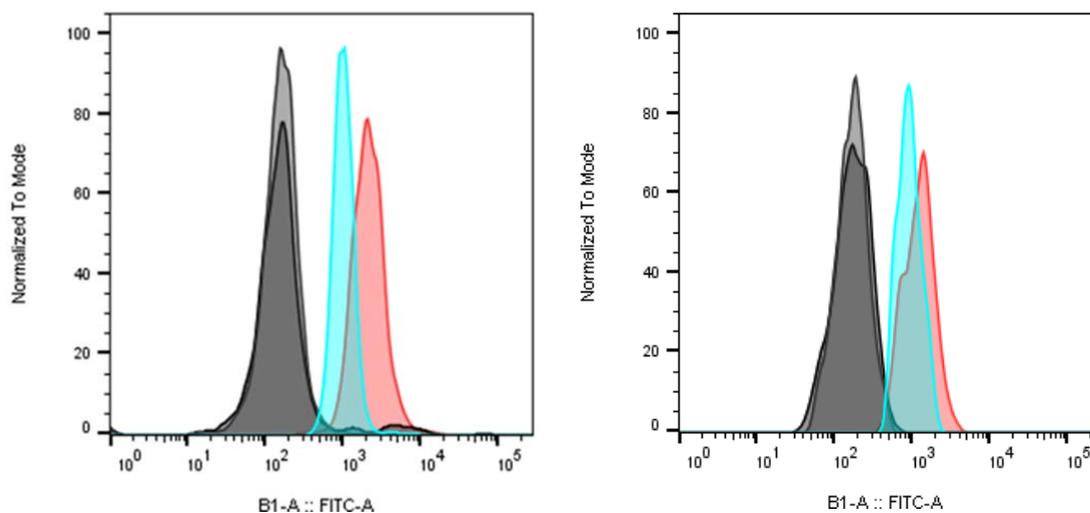


Figura 41: Dobles marcajes CD163 / TLR-2. Se muestran las superposiciones de histogramas de la intensidad de fluorescencia para TLR-2 sobre los monocitos CD163⁺ (izquierda) y CD163⁻ (derecha). Los picos grises se corresponden con la señal observada en los *minus one* correspondientes (grises claros para el instante pre-desafío y grises oscuros para el post-desafío), los picos azules corresponden a la intensidad de fluorescencia de TLR-2 antes del desafío mientras que los picos rosas se corresponden con el momento después del desafío. Se puede apreciar que el incremento de intensidad de fluorescencia tras el desafío es mayor en los CD163⁺. Todos los histogramas de ambas superposiciones provienen del mismo animal y estas imágenes son representativas de lo observado en los seis cerdos.

Concordando con esto, se encontró que, al comparar la IFMN de TLR-2 entre las subpoblaciones CD163⁺ y CD163⁻ tras la infección, ésta era significativamente más elevada en los CD163⁺ que en los CD163⁻ ($p = 0,002$). En cambio, al realizar la misma comparación en el momento antes de la infección, no se advirtieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,114$). Por último, como era de esperar a tenor de lo anterior, al comparar el incremento de la IFMN ($IFMN_{después} - IFMN_{antes}$) de los

monocitos CD163⁺ con el incremento de la IFMN de los monocitos CD163⁻, observamos que el incremento resultó significativamente más elevado en los CD163⁺ que en los CD163⁻ (p=0,04).

Todo esto indica que, además de producirse un incremento de expresión de TLR-2, tanto sobre los monocitos CD163⁺ como sobre los CD163⁻, éste es más intenso en los primeros. Además, observando los *dot plots* (Figura 42) parece que, tras la infección, se aprecia una tendencia de que, cuanto mayor sea la intensidad de expresión de CD163 mayor será la de TLR-2.

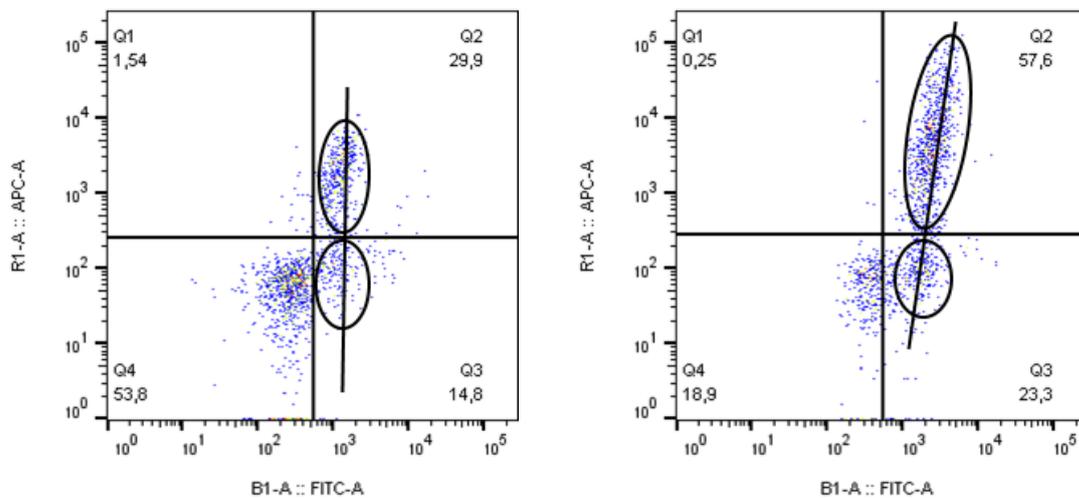


Figura 42: *Dot plots* CD163 / TLR2. Se representa la intensidad de fluorescencia de CD163 (ordenadas) frente a la intensidad de fluorescencia de TLR-2 (abscisas) antes de la infección (izquierda) y durante la sepsis (derecha). En el de la derecha se puede apreciar una tendencia en la que, cuanto mayor sea la intensidad de fluorescencia para CD163 mayor será la de TLR-2. Estos *dot plots* provienen del mismo animal y son representativos de lo observado en los 6 animales.

4.2.4.2. Resultados de Siglec-3

Al analizar los resultados para Siglec-3 en los dobles marcajes con CD163 nos encontramos con una situación similar a la observada para TLR-2. Durante la sepsis, en los seis animales se produjo un incremento de la IMFN en los monocitos CD163⁺ (Figura 43 izquierda) y, al comparar entre los dos momentos, observamos que comenzada la infección, la intensidad de expresión resultaba significativamente más elevada ($p = 0,001$).

En el caso de los eventos CD163⁻ observamos que en cinco de los seis animales se produjo un incremento pequeño de IMFN mientras que en el restante apenas se vio modificado (Figura 43 derecha). Aun así, al comparar los valores de IMFN antes y después se observó que después de la infección aparecían significativamente más elevados ($p = 0,013$).

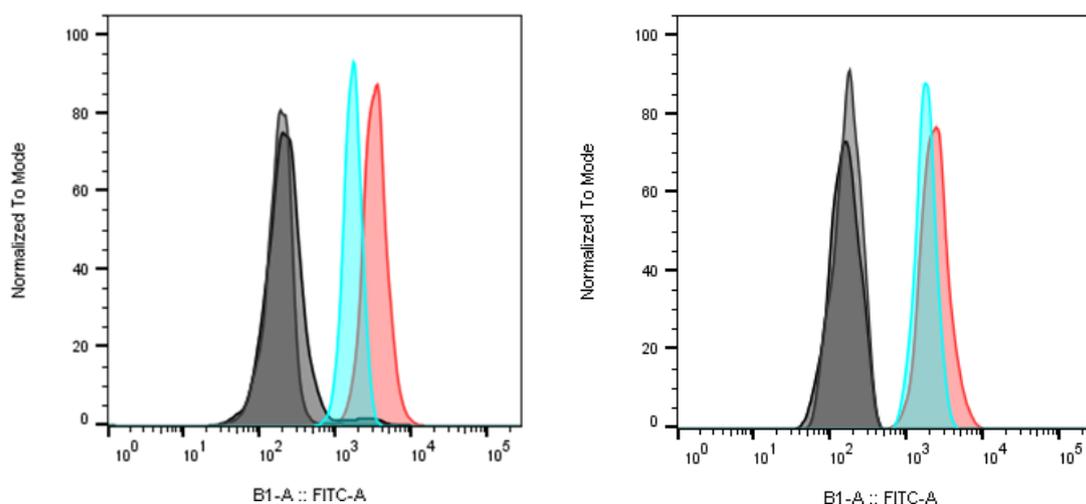


Figura 43: Dobles marcajes CD163 / Siglec-3. Se muestran las superposiciones de histogramas de la intensidad de fluorescencia para Siglec-3 sobre los monocitos CD163⁺ (izquierda) y CD163⁻ (derecha). Los picos grises se corresponden con la señal observada en los *minus one* correspondientes (grises claros para el instante pre-desafío y grises oscuros para el post-desafío); los picos azules, con la intensidad de fluorescencia de Siglec-3 antes del desafío mientras que los picos rosas se corresponden con el momento después del desafío. Se puede apreciar que el incremento de intensidad de fluorescencia tras el desafío es mayor en los eventos CD163⁺. Todos los histogramas de ambas superposiciones provienen del mismo animal y estas imágenes son representativas de lo observado en cinco de los seis animales, ya que el restante mostró unos valores muy similares para la expresión de Siglec-3 en CD163⁻ antes y después de la infección.

La comparación entre la IMFN de Siglec-3 entre los eventos CD163⁺ y CD163⁻ después de la infección mostró que la IMFN aparecía significativamente más elevada en los CD163⁺ que en los CD163⁻ ($p = 0,001$). Por el contrario, antes de la infección no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,481$) entre las IMFN de las dos subpoblaciones. Además, una vez establecida la infección al comparar el incremento de la IMFN de Siglec-3 en los monocitos CD163⁺ con el experimentado en los monocitos CD163⁻ se observó que resultaba significativamente más elevado en los CD163⁺ ($p = 0,001$). Todo esto es similar a lo observado para TLR-2 y, además, también en este caso los *dot plots* parecieron indicar que, después de la infección, hay una tendencia de que cuanto mayor sea la expresión de CD163 mayor será la de Siglec-3 (Figura 44).

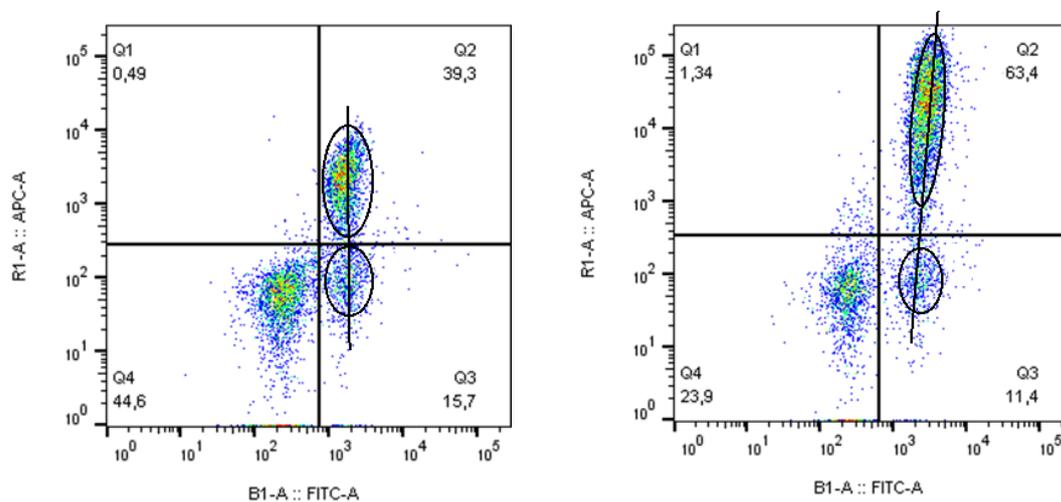


Figura 44: *Dot plots* CD163 / Siglec-3. Se representa la intensidad de fluorescencia de CD163 (ordenadas) frente a la intensidad de fluorescencia de Siglec-3 (abscisas) antes de la infección (izquierda) y durante la sepsis (derecha). En el de la derecha se puede apreciar una tendencia en la que, a mayor intensidad de fluorescencia para CD163 mayor será la de Siglec-3. Esa tendencia fue observada en los 6 animales.

4.2.4.3. Resultados de TLR-4

En el caso del TLR-4 los valores de IFMN descendieron ligeramente después de la infección en cinco animales, tanto en la subpoblación CD163⁺ como en la CD163⁻, mientras que en el restante prácticamente no sufrieron modificaciones. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre ambos momentos para la expresión de TLR-4 ni en los eventos CD163⁺ (Figura 45) ni en los CD163⁻ ($p = 0,067$ y $p = 0,061$, respectivamente). Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar la expresión de TLR-4 entre las células CD163⁺ y CD163⁻ ni antes ni después del desafío ($p = 0,122$ y $p = 0,255$, respectivamente).

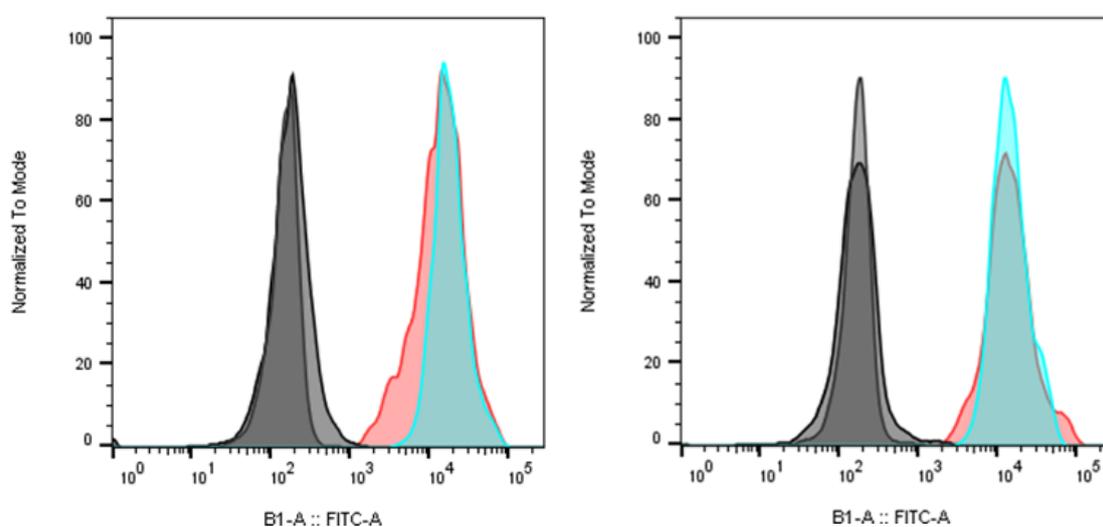


Figura 45: Dobles marcajes CD163 / TLR-4. Se muestra la superposición de histogramas con la expresión de TLR-4 en los monocitos CD163⁺. Los picos grises se corresponden con la señal observada en los *minus one* correspondientes (grises claros para el instante pre-desafío y grises oscuros para el post-desafío); los picos azules con la intensidad de fluorescencia de TLR-4 antes del desafío mientras que los picos rosas se corresponden con el momento después del desafío. La superposición de la izquierda es representativa de los cinco animales donde parece producirse una disminución de la IFMN de TLR-4. La superposición de la derecha procede del animal donde no parece modificarse la expresión de TLR-4 tras la infección.

4.2.4.4. Resultados de Siglec-5

Al comparar los valores de la IMFN para el Siglec-5 antes y después del desafío no se apreciaron diferencias significativas ni en los monocitos CD163⁺ ($p = 0,304$) ni en los CD163⁻ ($p = 0,075$). Sin embargo, no se pudo establecer una tendencia clara respecto a lo ocurrido tras la infección, puesto que para la subpoblación CD163⁺ nos encontramos con que la expresión del Siglec-5 se incrementaba en tres animales, se mantenía similar en dos y decrecía en el sexto. En el caso de las células CD163⁻, los valores de IMFN se incrementaron en cuatro animales, en otro disminuyeron y en el último se mantuvieron similares. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar la expresión del Siglec-5 entre las células CD163⁺ y CD163⁻ ni antes ni después del desafío ($p = 0,684$ y $p = 0,926$, respectivamente).

4.2.4.5. Resultados de CD163

Los eventos CD163⁺ resultaron prácticamente positivos en su totalidad para TLR-2, TLR-4, Siglec-3 y Siglec-5. Por ello, para estudiar las modificaciones de la expresión de CD163 en estos dobles marcajes se decidió seleccionar aquellos eventos de la región SSC-A/FSC-A de monocitos que fueran TLR-2⁺ y comparar antes y después la IMF de CD163 de la subpoblación CD163⁺/TLR2⁺. Seleccionando los eventos TLR-2⁺, se eliminaron aquellos linfocitos que pudieran estar presentes en la región SSC-A/FSC-A propia de los monocitos y que pudieran falsear resultados de la subpoblación CD163⁻.

En los seis animales se produjo un incremento considerable de la IMF de CD163 después de la infección (Figura 46). Al comparar la IMF de los seis animales antes del desafío con los mismos después de él, se observó que estos últimos presentaban una IMF significativamente más elevada ($p = 0,024$). A nivel de porcentajes de CD163⁺ sobre los TLR-2⁺ (monocitos), se advirtió un aumento en tres animales después del desafío, un descenso en otros dos, otro descenso muy ligero en otro animal y se mantuvo igual en el sexto cerdo.

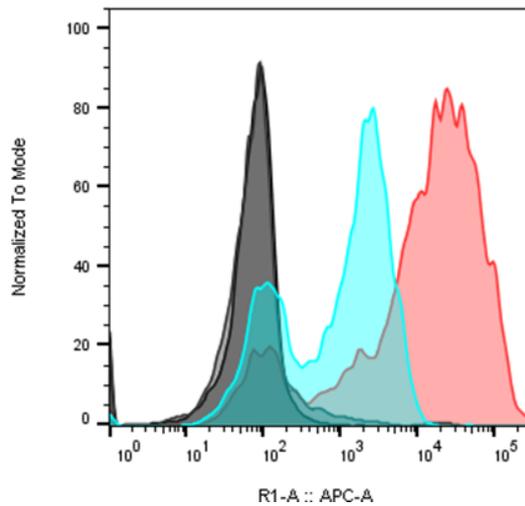


Figura 46: Expresión de CD163 en eventos TLR-2⁺. Se muestra la superposición entre histogramas de intensidad de fluorescencia en eventos TLR-2⁺ del tubo *minus one* para CD163 antes de la infección (gris claro), del *minus one* para CD163 tras la infección (gris oscuro), del positivo para CD163 antes de la infección (azul) y del positivo para CD163 tras la infección (rosa). Cada señal negativa del *minus one* fue utilizada para establecer el umbral a partir del cual considerar positiva la señal del tubo positivo para CD163 correspondiente. Los cuatro histogramas proceden del mismo animal y esta superposición es representativa de lo observado en los seis cerdos.

4.2.4.6. Resultados de Siglec-1

En el doble marcaje CD163/Siglec-1 se utilizaron cinco animales. Mientras que los eventos CD163⁺ resultaron siempre positivos para los marcadores anteriormente citados, en el caso del Siglec-1 aparecieron tanto subpoblaciones CD163⁺/Siglec-1⁺ como CD163⁺/Siglec-1⁻, estando presentes ambas tanto antes como después del desafío. En cambio, una pequeña subpoblación CD163⁻/Siglec-1⁺ presente antes del desafío prácticamente desapareció tras él (Figura 47).

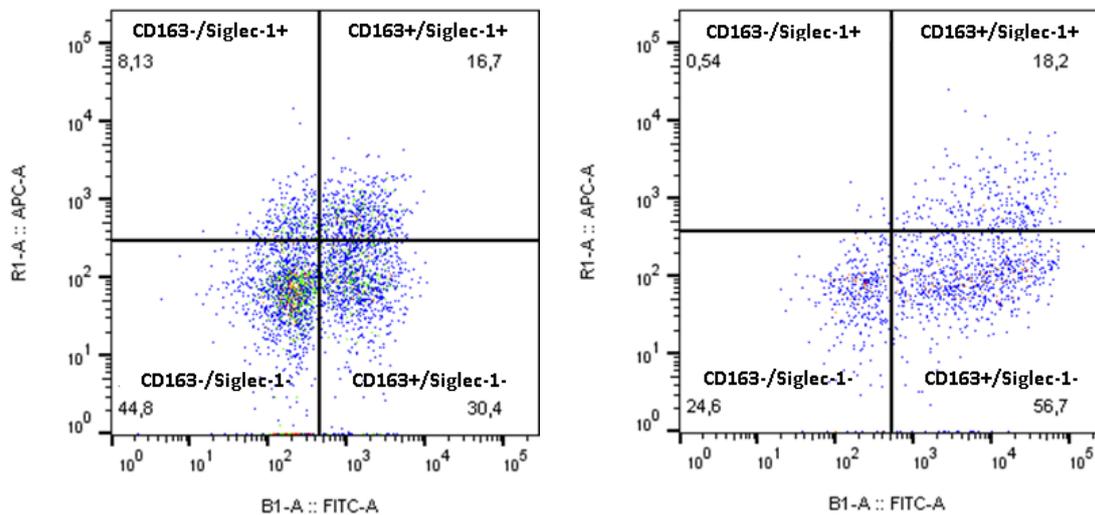


Figura 47: *Dot plots* CD163 / Siglec-1. Se representa la intensidad de fluorescencia de Siglec-1 (ordenadas) frente a la intensidad de fluorescencia de CD163 (abscisas) antes de la infección (izquierda) y durante la sepsis (derecha). Se puede apreciar como la pequeña subpoblación CD163⁻/Siglec-1⁺ presente antes del desafío desaparece tras la infección. Estos *dot plots* proceden de un mismo animal y son representativos de los cinco cerdos del estudio.

Con respecto a la IMF de Siglec-1, teniendo en cuenta solo la subpoblación CD163⁺/Siglec-1⁺, en cuatro de ellos se apreció un incremento después de la infección, mientras que en el restante se observó un descenso. Sin embargo, entre los dos momentos no se advirtieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,076$). Obviamente, no se pudo calcular cambio alguno para los eventos CD163⁻ porque la subpoblación CD163⁻/Siglec-1⁺ desaparecía una vez comenzada la infección.

4.2.5. Dobles marcajes con anticuerpo monoclonal 6D10

Como TLR-2, TLR-4, Siglec-3, Siglec-5 y CD172a también se expresan en granulocitos además de en monocitos, y como en la fracción de PBMCs es posible encontrar alguna contaminación por neutrófilos, se nos planteó la siguiente cuestión: ¿La liberación esperable de neutrófilos al torrente sanguíneo tras la infección podría conllevar un incremento de contaminación en los PBMCs aislados tras la infección con respecto a los PBMCs pre-desafío, que a su vez falseara los valores observados para algunos de estos marcadores en eventos CD172a^{+hi} o CD163⁻ tras la infección? Debe advertirse que, aunque las regiones establecidas por SSC/FSC eran propias de monocitos, siempre cabía la posibilidad de que apareciera en ellas algún neutrófilo. Para responder a esta cuestión se plantearon dobles marcajes de los marcadores TLR-2, TLR-4, Siglec-3 y Siglec-5 con el anticuerpo monoclonal 6D10, específico de granulocitos.

Estos dobles marcajes se realizaron sobre tres animales en paralelo respecto al momento en que se llevaban a cabo los dobles marcajes con anti-CD163. Como este anticuerpo es específico de granulocitos, se acotó una región SSC-A/FSC-A propia de monocitos y se seleccionaron los eventos 6D10⁻, de esta manera se aseguró que se estaban manejando únicamente monocitos. Sobre estos eventos se verificó si las tendencias para la expresión de estos marcadores una vez iniciada la infección eran similares a las observadas en los eventos CD172a^{+hi} o CD163⁻ de los anteriores dobles maecajes. Los resultados permitieron descartar la influencia de la contaminación por neutrófilos en los resultados previamente observados, ya que estos fueron similares a los observados en los eventos 6D10⁻ (Figura 48). TLR-2 y Siglec-3 sufrieron un incremento significativo de sus IFMN después de la infección ($p = 0,033$ y $p = 0,039$, respectivamente), aumentando su

expresión en los tres animales tras el desafío. TLR-4 y Siglec-5 no resultaron modificados significativamente después de la infección ($p = 0,427$ y $p = 0,26$, respectivamente); además, en el caso de TLR-4, los tres animales se mantuvieron prácticamente con los mismos valores.

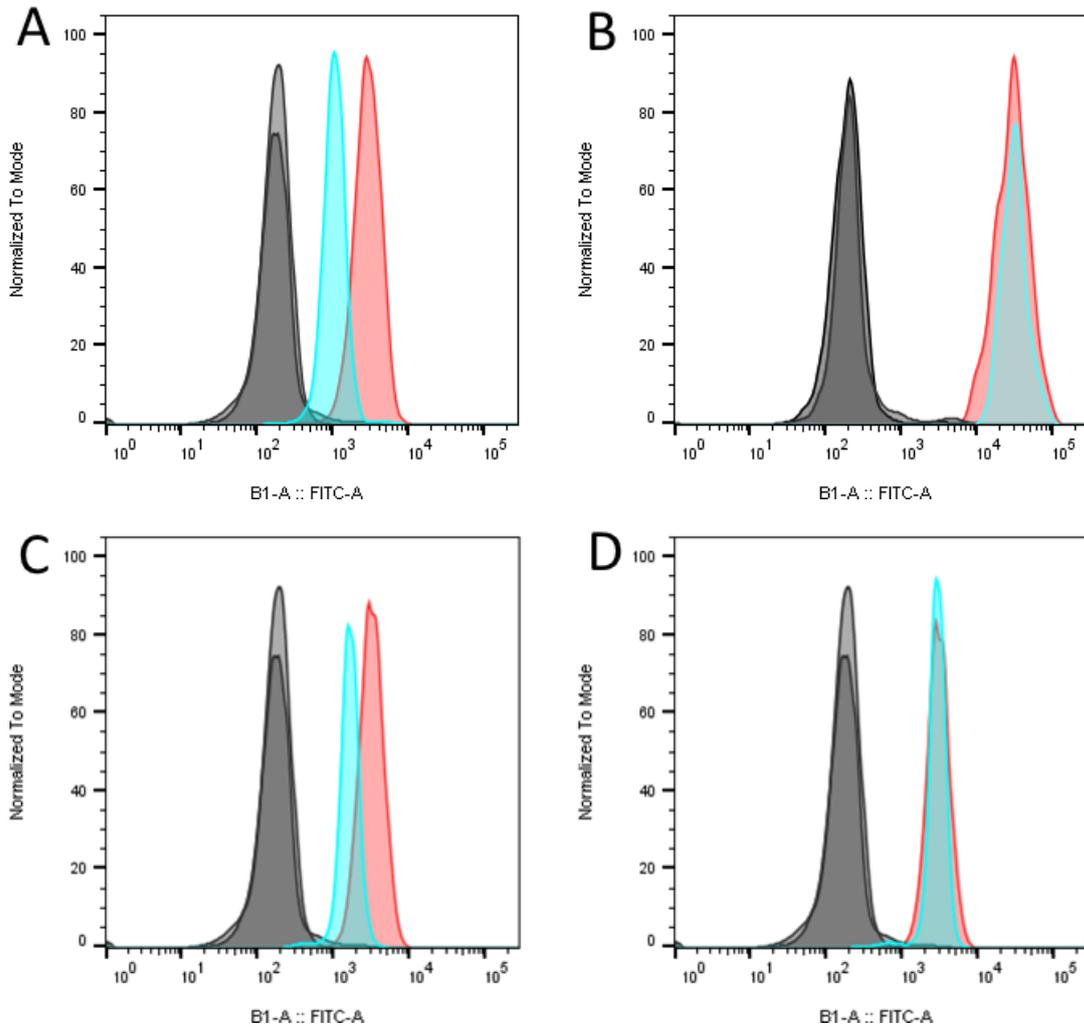


Figura 48: Dobles marcajes con el anticuerpo monoclonal 6D10. Se representan las superposiciones entre histogramas de intensidad de fluorescencia en monocitos para TLR-2 (A), TLR-4 (B), Siglec-3 (C) o Siglec-5 (D) antes de la infección (azul) y tras la infección (rosa). Los picos de los *minus one* correspondientes a antes de la infección se representan en gris claro; y en gris oscuro para después. Los resultados observados confirmaron los anteriores. Los histogramas de cada superposición proceden de un mismo animal. Estas superposiciones son representativas de los resultados observados en los tres cerdos.

4.3. BÚSQUEDA MEDIANTE ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS DE PROTEÍNAS SOBREENPRESADAS EN LA SUPERFICIE DE *H. parasuis* EN CONDICIONES DE CULTIVO MIMÉTICAS A LA INFECCIÓN

4.3.1. Curvas de crecimiento

Al comparar las curvas de crecimiento de la cepa Nagasaki creciendo en condiciones normales de cultivo (37 °C), condiciones restrictivas de hierro (37 °C y presencia de dipiridilo) y condiciones miméticas (41 °C y dipiridilo) parece inferirse que la temperatura afecta ligeramente al crecimiento puesto que a 41 °C, antes de la adición del dipiridilo, se aprecia que la DO a 600 nm no alcanza la obtenida para 37 °C. Tras la adición del dipiridilo al medio también se aprecia esta influencia de la temperatura ya que la DO del crecimiento a 41 °C siempre se mantiene menor a la de 37 °C. Además, se observó que la adición de dipiridilo desaceleraba el crecimiento en ambas temperaturas para, al cabo de un tiempo, volver a acelerarse (Figura 49).

En base a estas curvas se seleccionaron momentos de crecimiento exponencial para extraer ARN de los cultivos en las condiciones sobre las que se realizaría el estudio comparativo, las normales (37 °C sin didipiridilo) y las miméticas (41 °C y dipiridilo).

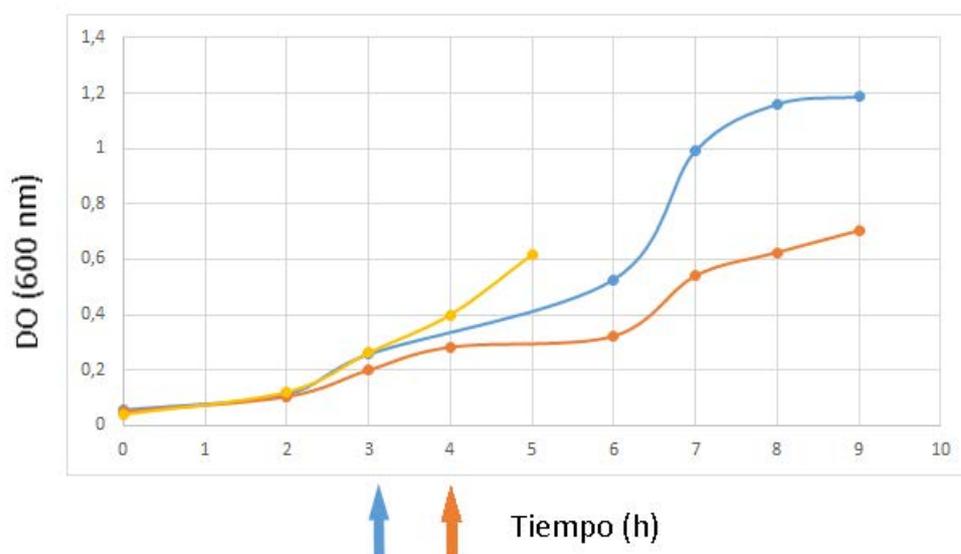


Figura 9: Curvas de crecimiento de *H. parasuis* en condiciones normales de crecimiento (amarillo), condiciones restrictivas de hierro a 37 °C (azul) y condiciones miméticas de infección (naranja). El dipiridilo fue añadido cuando la DO a 600 nm se situaba en torno a 0,3 y se indica con una flecha del color correspondiente a la condición (azul para condiciones restrictivas de hierro a 37 °C y naranja para condiciones miméticas).

4.3.2. Control de calidad de las muestras de ARN

En total se hicieron tres réplicas de cada condición, por lo tanto seis muestras de ARN, las cuales fueron tratadas para eliminar los restos de ADN. Posteriormente fueron evaluadas mediante un “NanoDrop 1000” (Thermo Scientific) para conocer sus concentraciones y ratios (260/280 y 260/230), se realizó una PCR con cebadores específicos del gen 16S de *H. parasuis* para verificar la eliminación completa de ADN y, por último, una electroforesis automatizada en un “Bioanalyzer Agilent 2100” para comprobar la integridad del ARN y confirmar el perfil de los picos de ARN ribosómico propio de la bacteria, en el que la subunidad 23S del ARNr se encuentra fragmentada en porciones de 1,2 y 1,7 kb (Song *et al.*, 1999). No se calculó el número de integridad del ARN (RIN por sus siglas en inglés), debido a la disposición peculiar de los picos del ARNr de esta bacteria; no obstante, las gráficas mostraron que el ARN presente en cada muestra presentaba una integridad correcta. En la Tabla 26 se resumen los diferentes valores para cada muestra obtenidos mediante el “NanoDrop 1000” y la PCR; en la Figura 50 se observan los perfiles de picos del ARN ribosómico.

Muestra	[RNA] ng/μl	r260/280	r260/230	PCR
Normal 1	106,8	2,18	2,02	-
Normal 2	143,7	2,11	2,09	-
Normal 3	139,8	2,09	2,08	-
Mimética 1	158	2,15	1,97	-
Mimética 2	131,7	2,16	2,1	-
Mimética 3	138,7	2,17	2,08	-

Tabla 26: Concentración, ratios y contaminación por ADN en muestras de ARN estudiadas. Se indica para cada una de las muestras del estudio la concentración, las *ratios* 260/280 y 260/230, así como el resultado de la PCR con cebadores específicos de la bacteria (todas dieron negativos)

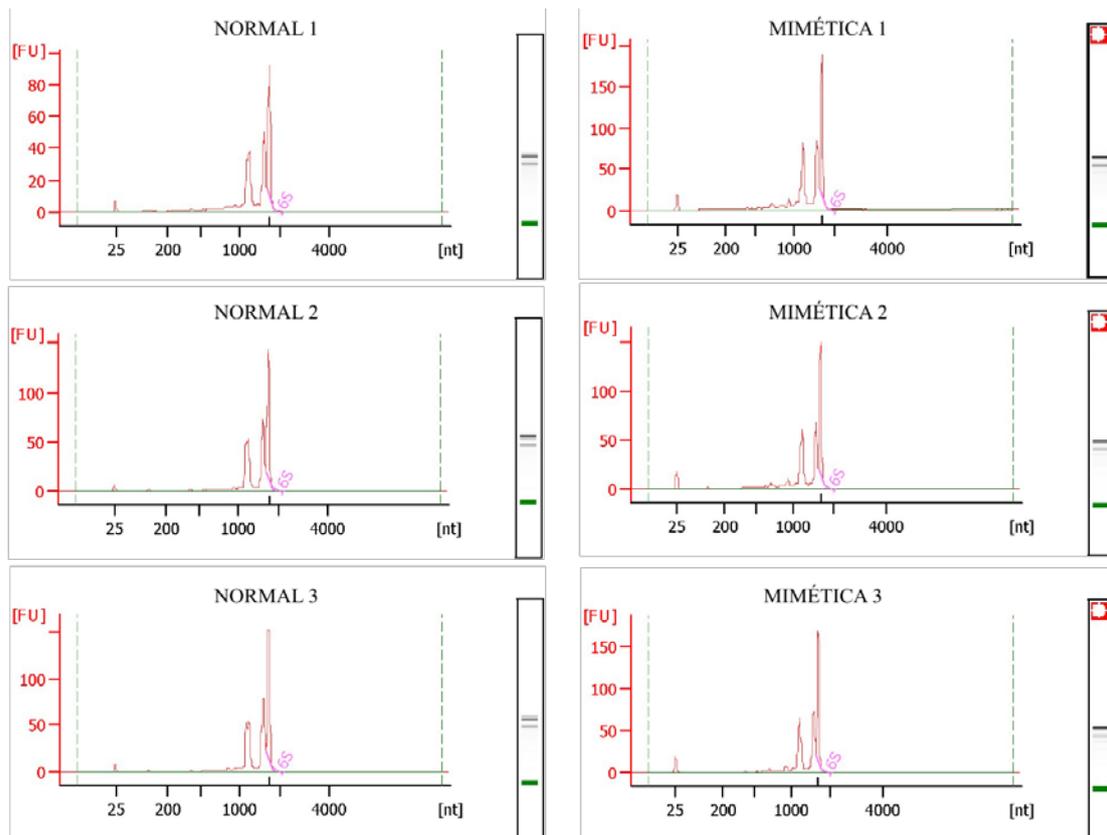


Figura 50: Integridad del ARN en muestras estudiadas. Se muestran las gráficas de las seis muestras de ARN en las que se muestran los picos de ARN ribosómico. En ninguna aparece el pico correspondiente al ARN ribosómico 23S y en su lugar se aprecian dos picos adicionales de aproximadamente 1.200 y 1.700 bases, característicos de *H. parasuis*. Las imágenes muestran una buena conservación de la integridad del ARN.

4.3.3. Control de calidad de las secuencias de las librerías

La calidad de las lecturas obtenidas tras la preparación y secuenciación de las librerías de ADNc se evaluó empleando FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las secuencias fueron pre-procesadas mediante un recorte (*trimming*) de las 10 primeras pb (*left trimming*) y de aquellas que tuvieran un umbral de calidad $Q < 20$ (*right trimming*). En la Tabla 27 se muestra el número de secuencias de cada muestra tras el control de calidad.

MUESTRA	SECUENCIAS TOTALES
Normal 1	20025325
Normal 2	19420056
Normal 3	23019827
Mimética 1	25745193
Mimética 2	26052042
Mimética 3	28740311

Tabla 27: Control de calidad de secuencias de librerías de ADNc. Se muestra el número de secuencias de cada muestra, después de efectuar su pre-procesado y análisis con FastQC.

4.3.4. Genes expresados diferencialmente

Las secuencias fueron alineadas frente al genoma de referencia (*H. parasuis*, cepa SH0165, número de acceso: NC_011852.1) con la herramienta Tophat, ensambladas con Cufflinks y fusionadas con Cuffmerge. Los diferentes genes fueron denominados con el nombre del locus del genoma de referencia. Los transcritos expresados diferencialmente entre las dos condiciones de cultivo (normal y mimética) fueron obtenidos mediante la herramienta bioinformática Cuffdiff, considerando estadísticamente significativos solamente aquellos casos que presentasen un valor p, corregido mediante el método de Benjamini–Hochberg, inferior a 0,05.

A partir de ahora, nos referiremos a los genes sobreexpresados en condiciones miméticas de cultivo como “sobreexpresados en condiciones miméticas”, mientras que los genes sobreexpresados en condiciones normales serán denominados como “subexpresados en condiciones miméticas”. En las Tablas 36 y 37 de los anexos se muestran los genes sobreexpresados y subexpresados, respectivamente, indicando el logaritmo en base 2 de su *fold change* ($\log_2(\text{fold change})$) para cada caso. En el análisis de datos posteriores solo se tuvieron en cuenta aquellos genes cuyo $\log_2(\text{fold change})$ fuera superior a 10.

4.3.4.1. Sobreexpresión en condiciones miméticas

El número de genes sobreexpresados en estas condiciones fue de 433, de los cuales se seleccionaron 154 por tener un $\log_2(\text{fold change})$ superior a 10. Entre ellos, se encontraron 8 pseudogenes, dos genes codificantes de ARNt y 144 genes codificantes de proteínas (Figura 51 arriba a la izquierda).

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes sobreexpresados. A partir de estas secuencias proteicas se investigó la localización de las proteínas dentro de la célula y si presentaban relación con la patogenicidad.

4.3.4.1.1. Localización celular de las proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas

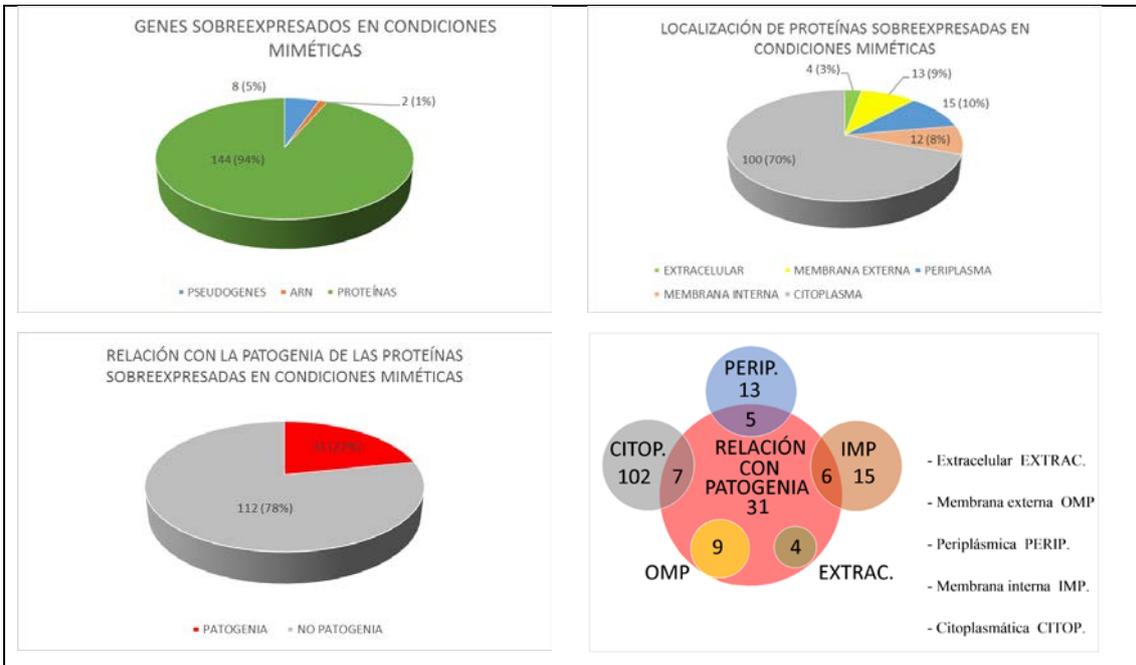
Con el programa CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) se estudiaron las secuencias de las proteínas sobreexpresadas, con el fin de asignar la localización celular más probable a cada una de ellas. Se encontraron cuatro proteínas de localización extracelular, 17 de membrana externa (OMP), 10 de localización periplásmica, 13 de membrana interna (IMP) y 100 localizadas en el citoplasma. Como el principal objetivo de este trabajo consistía en la búsqueda de proteínas expuestas al exterior celular, que se sobreexpresaran en las condiciones de estudio, se procedió a verificar individualmente la localización de aquellas a las que CELLO asignaba como pertenecientes a las fracciones extracelular y de OMP, por medio de su búsqueda en bases de datos. De este modo, se comprobó que dos de las proteínas asignadas como OMPs realmente eran IMPs, mientras que otras tres presentaban una localización periplásmica y otras dos resultaban citoplasmáticas. Además, una de las proteínas extracelulares y otra de las asignadas como OMP parecían tratarse realmente de la misma proteína extracelular pero, debido a una mutación puntual en el genoma de referencia que implicaba la aparición de un codón de parada, fue anotada como dos proteínas diferentes. Por lo tanto, tras esta corrección, cuatro proteínas permanecieron asignadas como de localización extracelular, 9 como OMPs, 15 como IMPs, 13 de localización periplásmica y 102 citoplasmática (Figura 51 arriba a la derecha).

4.3.4.1.2. Búsqueda de proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas relacionadas con la patogenicidad

Se utilizó el servidor MP3 para detectar aquellas proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas que pudieran presentar una relación con la patogenicidad. En total, 30

proteínas fueron reconocidas relacionadas con la patogenicidad (y por lo tanto posiblemente implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Glässer) (Figura 51 abajo a la izquierda), de las que 4 presentaban una localización extracelular, 9 resultaron ser OMPs, 6 IMPs, 5 de localización periplásmica y 7 citoplasmática (Figura 51 abajo a la derecha).

Además, aquellas proteínas identificadas como relacionadas con la patogenicidad por MP3, que no estaban caracterizadas ni en la base de datos del “Genbank” ni en la de “Uniprot”, fueron estudiadas individualmente mediante “BLASTp” en la página del “Ncbi” para intentar encontrar proteínas homólogas, o mediante búsqueda de dominios, utilizando para ello la herramienta disponible en el “Ncbi” o en “InterProScan”. En la Tabla 29 se resume lo obtenido respecto a estas proteínas.



Arriba a la izquierda: Número de pseudogenes, genes codificantes de ARNt y de proteínas; indicando el porcentaje sobre el total de genes sobreexpresados con $\log_2(\text{fold change}) > 10$ en condiciones miméticas. No se tuvieron en cuenta las correcciones posteriores.

Arriba a la derecha: Número de las diferentes localizaciones de proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas y porcentaje sobre el total. Se tienen en cuenta las correcciones posteriores.

Abajo a la izquierda: Número y porcentaje de proteínas relacionadas con la patogenicidad sobreexpresadas en condiciones miméticas. Se tienen en cuenta las correcciones posteriores.

Abajo a la derecha: Diagrama de Venn, que representa la relación entre la localización celular y la patogenicidad de las proteínas sobreexpresadas. Se tienen en cuenta las correcciones posteriores.

Figura 51: Genes y proteínas sobreexpresados en condiciones miméticas.

4.3.4.1.3. Análisis de enriquecimiento funcional de genes sobreexpresados en condiciones miméticas

El análisis de enriquecimiento funcional en términos de ontología génica (GO) se realizó mediante el servidor DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>). Solo se tuvieron en cuenta aquellos términos GO que contuvieran un número mínimo de cinco genes sobreexpresados y se consideraron significativamente enriquecidos aquellos términos GO que mostraran un valor p, corregido mediante el método de Benjamini-Hochberg, inferior a 0,05. Aplicando estos criterios, entre los genes sobreexpresados en condiciones miméticas tan solo se halló enriquecido el término GO:0003676 (*nucleic acid binding*), el cual se encontró en 37 genes sobreexpresados. Dicho término pertenece al dominio GO *molecular function*. En la Tabla 38 de los anexos se muestran los genes sobreexpresados clasificados dentro de dicho término GO.

4.3.4.1.4. Resumen de la sobreexpresión en condiciones miméticas

En la Figura 52 se resumen los principales hallazgos conforme a la sobreexpresión en condiciones miméticas.

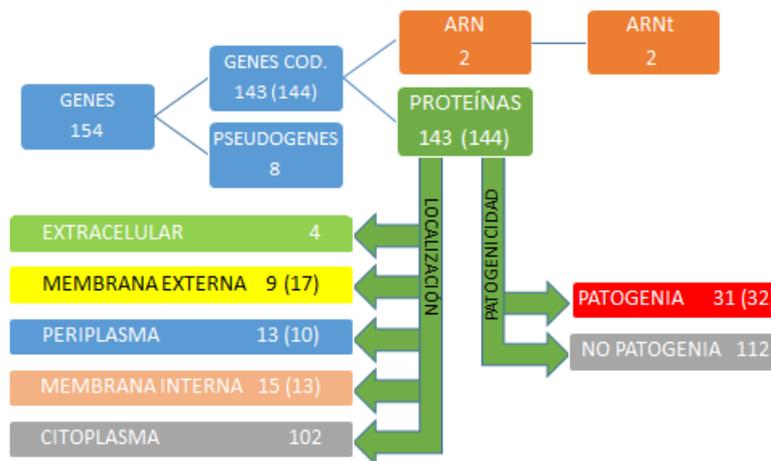


Figura 52: Resumen de la sobreexpresión en condiciones miméticas. Se indica el número de eventos pertenecientes a cada grupo. Entre paréntesis, el número antes de las correcciones.

En la Tabla 28 se resumen aquellas proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas que fueron identificadas como relacionadas con la patogenicidad y/o se les predijo una localización extracelular o en la membrana externa (en las tablas de esta sección y en las de los anexos, se indican los nombres de las proteínas y/o genes en inglés debido al gran número de ellos y a que se denominan en ese idioma en las bases de datos).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	Número acceso Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS00370</i>	protein TolA	B8F375	tolA Cell envelope integrity inner membrane protein TolA	P	IM
<i>HAPS_RS00485</i>	TonB-dependent receptor	-	-	P	OM
<i>HAPS_RS00735</i>	hypothetical protein	-	-	P	OM
<i>HAPS_RS00740*</i>	autotransporter domain-containing protein	-	-	P*	OM*
<i>HAPS_RS00745*</i>	hypothetical protein	-	-	P*	EX*
<i>HAPS_RS01255</i>	ABC transporter permease	B8F3P0	HAPS_0253 ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport permease	P	IM
<i>HAPS_RS01260</i>	ABC transporter substrate-binding protein	B8F3P1	HAPS_0254 ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems periplasmic components protein	P	CP
<i>HAPS_RS01265</i>	ABC transporter ATP-binding protein	B8F3P2	HAPS_0255 ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, ATPase	P	IM
<i>HAPS_RS01400</i>	sulfurtransferase FdhD	-	-	P	CP
<i>HAPS_RS01435</i>	hypothetical protein	B8F3S4	HAPS_0289 Uncharacterized protein	P	CP
<i>HAPS_RS01805</i>	ABC transporter ATPase	B8F3Z5	HAPS_0364 ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains-containing protein	P	PP
<i>HAPS_RS01895</i>	hypothetical protein	B8F410	HAPS_0382 Uncharacterized protein	P	EX
<i>HAPS_RS02610</i>	hypothetical protein	B8F4D5	purL Phosphoribosylformylglycinamide synthase	P	CP
<i>HAPS_RS03735</i>	fimbrial usher protein	-	-	P	OM
<i>HAPS_RS04480</i>	hypothetical protein	-	-	P	PP
<i>HAPS_RS04485</i>	hypothetical protein	B8F5E9	HAPS_0923 Uncharacterized protein	P	EX
<i>HAPS_RS06520</i>	hypothetical protein	B8F6H3	yaaH Permease, Inner membrane protein yaaH	P	IM

Tabla 28: Listado de proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas que resultaron relacionadas con la patogenia (P) y/o localizadas en la membrana externa (OM) o extracelulares (EX). En caso de cumplir solamente uno de los criterios también se indica si no está relacionada con la patogenia (NP) o si tiene otra localización diferente (IM para membrana interna, CP para citoplasma y PP para periplasma). * indica que se trataba de una misma proteína reconocida como dos diferentes.

<i>Locus</i>	Producto Genbank	Número acceso Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS06610</i>	cell envelope protein TonB	B8F6J2	tonB Protein TonB	P	PP
<i>HAPS_RS07630</i>	iron ABC transporter permease	B8F723	hmuU Hemin transport system permease protein HmuU	P	IM
<i>HAPS_RS07950</i>	hypothetical protein	-	-	P	CP
<i>HAPS_RS09000</i>	hypothetical protein	B8F7Q0	HAPS_1850 Uncharacterized protein	P	IM
<i>HAPS_RS10195</i>	DUF262 domain-containing protein	B8F899	HAPS_2100 Uncharacterized protein	P	CP
<i>HAPS_RS10530</i>	TolC family protein	B8F8F2	tolC RND efflux system outer membrane lipoprotein/RND superfamily resistance-nodulation-cell division antiporter	P	OM
<i>HAPS_RS10585</i>	ligand-gated channel	B8F8G2	hxC Heme/hemopexin utilization protein C/outer membrane receptor protein, mostly Fe transport	P	OM
<i>HAPS_RS10590</i>	ShlB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein	B8F8G3	hxB Heme/hemopexin-binding protein B, hemolysin activation/secretion protein	P	OM
<i>HAPS_RS10595</i>	hypothetical protein	B8F8G4	hxA Heme/hemopexin-binding protein A (Heme:hemopexin utilization protein A)	P	EX
<i>HAPS_RS10780</i>	membrane protein	B8F8J9	HAPS_2219 Possible outer membrane protein/FOG: TPR repeat protein	P	OM
<i>HAPS_RS10800</i>	transferrin-binding protein-like solute binding protein	-	-	P	OM
<i>HAPS_RS10805</i>	lactoferrin/transferrin family TonB-dependent receptor	B8F8K4	tbpA Transferrin-binding protein 1	P	OM
<i>HAPS_RS11010</i>	transpeptidase	B8F8P5	HAPS_2267 Uncharacterized protein	P	PP
<i>HAPS_RS11030</i>	transcriptional regulator	B8F8P9	impA SOS-response transcriptional repressor	P	CP

Tabla 28 (continuación): Listado de proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas que resultaron relacionadas con la patogenia (P) y/o localizadas en la membrana externa (OM) o extracelulares (EX). En caso de cumplir solamente uno de los criterios también se indica si no está relacionada con la patogenia (NP) o si tiene otra localización diferente (IM para membrana interna, CP para citoplasma y PP para periplasma).

Gen	Número acceso uniprot	Localización	Hallazgos
<i>HAPS_RS00735</i>	-	OM	No se reconoció nada
<i>HAPS_RS00740*</i>	-	OM*	Mitad c-terminal de autotransportador*
<i>HAPS_RS00745*</i>	-	EX*	Mitad n-terminal de autotransportador*
<i>HAPS_RS01435</i>	B8F3S4	CP	No se reconoció nada
<i>HAPS_RS01895</i>	B8F410	EX	No se reconoció nada
<i>HAPS_RS04480</i>	-	PP	Dominio de la superfamilia <i>Glycoside-hydrolase</i>
<i>HAPS_RS04485</i>	B8F5E9	EX	Dominio <i>Immunoglobulin-like fold</i>
<i>HAPS_RS07950</i>	-	CP	Dominio de la superfamilia <i>Thioredoxin_like</i>
<i>HAPS_RS09000</i>	B8F7Q0	IM	Homología con permeasa
<i>HAPS_RS10195</i>	B8F899	CP	Dominios de nucleasas <i>ParB-like</i> y HNH

Tabla 29: Hallazgos en proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas, relacionadas con la patogenia, que no se encuentran caracterizadas en la base de datos del “Genbank” ni en la de “Uniprot”.

* indica que se trataba de una misma proteína reconocida como dos diferentes.

En la Tabla 34 de los anexos se recogen los 154 genes sobreexpresados con un $\log_2(\text{fold change}) > 10$ y en el caso de las 144 proteínas sobreexpresadas se indica:

- *Locus* del gen codificante (*Locus Tag*) y nombre de producto procedentes de la base de datos del “Genbank”. Nombre y número de acceso de la base datos “Uniprot” (en caso de estar en su base de datos).
- Localización celular más probable corregida.
- Si está o no relacionada con la patogenia.

4.3.4.2. Subexpresión en condiciones miméticas

El número de genes subexpresados en condiciones miméticas fue de 460, de los cuales se seleccionaron 187 por tener un \log_2 (*fold Change*) superior a 10. Entre ellos se encontraron 4 pseudogenes, 7 genes que codifican ARNt, otro que codifica ARNr y 175 genes de proteínas (Figura 53 arriba a la izquierda).

4.3.4.2.1. Localización celular de las proteínas subexpresadas en condiciones miméticas

El programa CELLO v.2.5 predijo 6 proteínas de localización extracelular, 5 OMPs, 30 de localización periplásmica, 34 de membrana interna IMPs y 100 localizadas en el citoplasma. Nuevamente se verificaron individualmente aquellas proteínas asignadas como OMP o extracelulares, comprobando que una de las supuestas OMP realmente presentaba una localización citoplasmática. Después de esta corrección 6 proteínas permanecieron asignadas como de localización extracelular, 4 como OMPs, 34 como IMPs, 30 de localización periplásmica, y 101 citoplasmática (Figura 53 arriba a la derecha).

4.3.4.2.2. Búsqueda de proteínas subexpresadas en condiciones miméticas relacionadas con la patogenicidad

El servidor MP3 encontró un total de 34 proteínas que fueron reconocidas como relacionadas con la patogenicidad (Figura 53 abajo a la izquierda), de las cuales 5 resultaron tener una localización extracelular, 3 eran OMPs, 13 IMPs, 8 presentaban localización periplásmica y 5 citoplasmática (Figura 53 abajo a la derecha). Además, nuevamente se efectuó una búsqueda individual de homologías y dominios en aquellas proteínas identificadas como relacionadas con la patogenicidad, que no se encontraban caracterizadas en la base de datos del “Genbank” ni en la de “Uniprot”. En la Tabla 32 se resume lo hallado en estas proteínas.

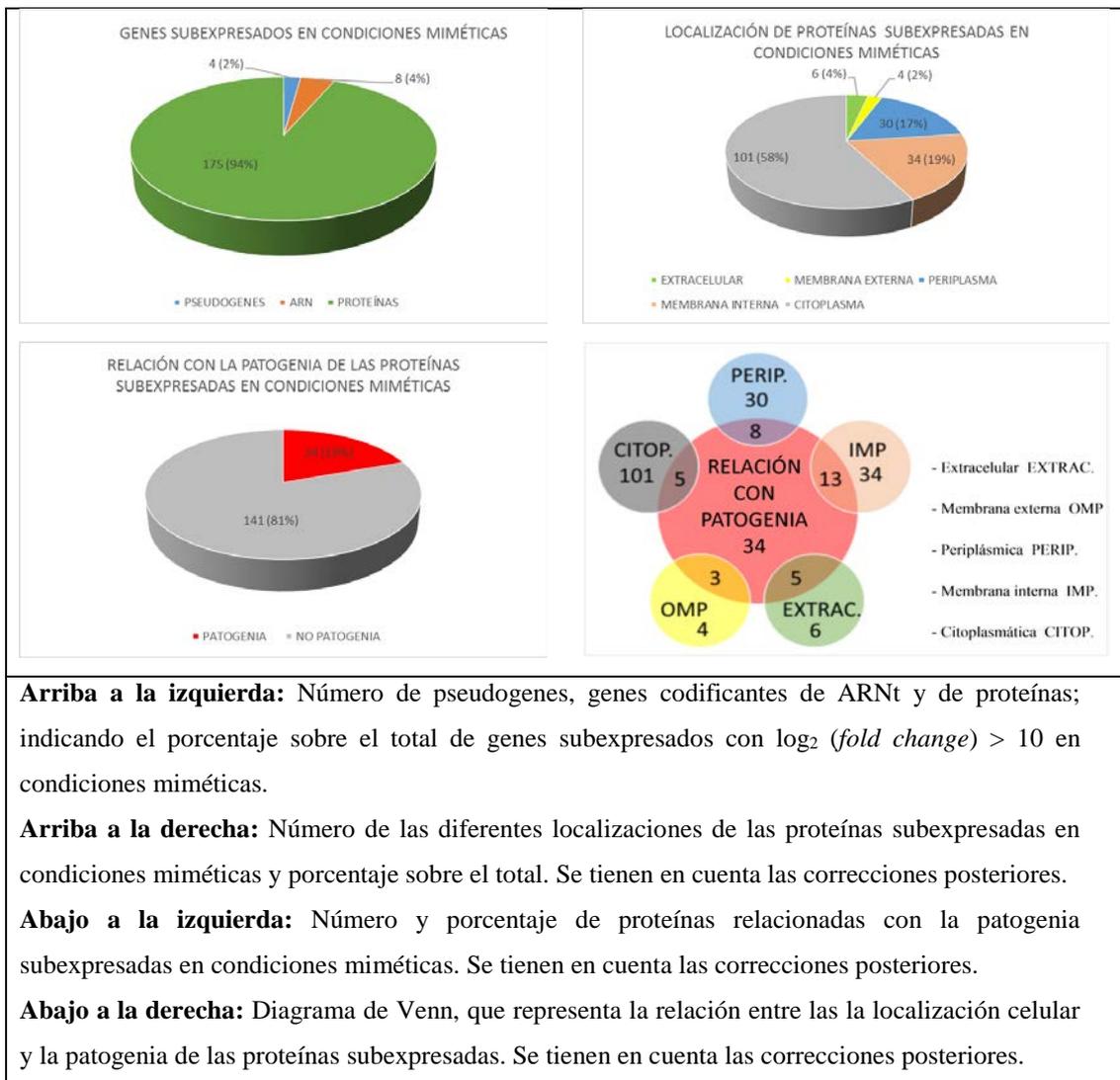


Figura 53: Genes y proteínas subexpresados en condiciones miméticas

4.3.4.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes subexpresados en condiciones miméticas

El análisis de enriquecimiento funcional se realizó aplicando los mismos criterios que en el caso de los genes sobreexpresados. En la Tabla 30 se muestran aquellos términos GO que se encontraron enriquecidos en condiciones miméticas, indicando para cada uno el número de genes subexpresados en el que se encontró y el dominio GO al que pertenece.

TÉRMINO GO	DOMINIO GO	NUM. GENES
GO:0008643 <i>carbohydrate transport</i>	BP	16
GO:0015980 <i>energy derivation by oxidation of organic compounds</i>	BP	17
GO:0055114 <i>oxidation-reduction process</i>	BP	21
GO:0009401 <i>phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system</i>	BP	13
GO:0009401 <i>phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system</i>	BP	13
GO:0006091 <i>generation of precursor metabolites and energy</i>	BP	19
GO:0045333 <i>cellular respiration</i>	BP	14
GO:0006099 <i>tricarboxylic acid cycle</i>	BP	10
GO:0006099 <i>tricarboxylic acid cycle</i>	BP	10
GO:0009060 <i>aerobic respiration</i>	BP	10
GO:0044712 <i>single-organism catabolic process</i>	BP	17
GO:0044699 <i>single-organism process</i>	BP	73
GO:0005975 <i>carbohydrate metabolic process</i>	BP	25
GO:0044724 <i>single-organism carbohydrate catabolic process</i>	BP	11
GO:0044282 <i>small molecule catabolic process</i>	BP	12
GO:0016052 <i>carbohydrate catabolic process</i>	BP	11
GO:1901575 <i>organic substance catabolic process</i>	BP	18
GO:1901476 <i>carbohydrate transporter activity</i>	MF	8
GO:0015144 <i>carbohydrate transmembrane transporter activity</i>	MF	8
GO:0044765 <i>single-organism transport</i>	BP	23
GO:0009056 <i>catabolic process</i>	BP	18
GO:0005996 <i>monosaccharide metabolic process</i>	BP	10
GO:1902578 <i>single-organism localization</i>	BP	23
GO:0071702 <i>organic substance transport</i>	BP	17
GO:0044723 <i>single-organism carbohydrate metabolic process</i>	BP	17
GO:0006810 <i>transport</i>	BP	26
GO:0019318 <i>hexose metabolic process</i>	BP	8
GO:0051179 <i>localization</i>	BP	26
GO:0051234 <i>establishment of localization</i>	BP	26
GO:0044710 <i>single-organism metabolic process</i>	BP	49
GO:0046365 <i>monosaccharide catabolic process</i>	BP	5

Tabla 30: Términos GO enriquecidos entre los genes subexpresados en condiciones miméticas. Se indica el número de genes subexpresados en el que se hallaron y el dominio GO al que pertenecen (MF para *molecular function* y BP para *biological process*).

4.3.4.2.4. Resumen de la subexpresión en condiciones miméticas

En la Figura 54 se resumen los principales hallazgos, conforme a la subexpresión en condiciones miméticas.

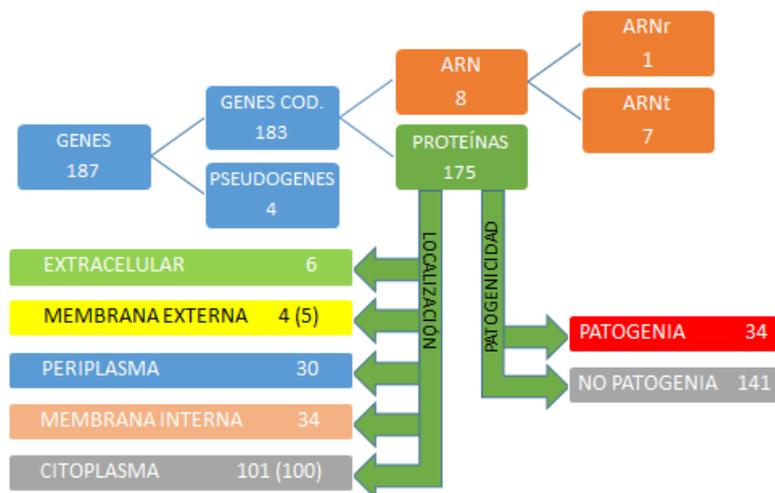


Figura 54:

Resumen de subexpresión en condiciones miméticas. Se indica el número de eventos pertenecientes a cada grupo. Entre paréntesis, el número antes de las correcciones.

En la Tabla 35 de los anexos se recogen los 187 genes subexpresados con un \log_2 (*fold change*) > 10 y en el caso de las 175 proteínas subexpresadas se indica:

- *Locus* del gen codificante (*locus tag*) y nombre de producto procedentes de la base de datos del “Genbank”. Nombre y número de acceso de la base datos “Uniprot” (en caso de estar en su base de datos).
- Localización celular más probable corregida.
- Si está o no relacionada con la patogenicidad.

En la siguiente Tabla (31) se resumen aquellas proteínas subexpresadas en condiciones miméticas, que fueron identificadas como relacionadas con la patogenicidad y/o se les predijo una localización extracelular o en la membrana externa.

<i>Locus</i>	<i>Producto Genbank</i>	Número acceso Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS00960</i>	PTS fructose transporter subunit IID	B8F3I5	ptsEIID PTS system, IIDcomponent	P	IM
<i>HAPS_RS00965</i>	PTS sugar transporter subunit IIC	B8F3I6	ptsEIIC PTS system, IIC component	P	IM
<i>HAPS_RS01175</i>	maltose transporter permease	B8F3M4	malG ABC-type maltose transport systems, permease component	P	IM
<i>HAPS_RS01180</i>	maltose ABC transporter permease MalF	B8F3M5	malF ABC-type maltose transport systems, permease components	P	IM
<i>HAPS_RS01320</i>	tRNA-dihydrouridine synthase A			P	CP
<i>HAPS_RS02505</i>	MarC family protein	B8F4B7	marC UPF0056 inner membrane protein	P	IM
<i>HAPS_RS02890</i>	phage tail protein/putative Fels-1 prophage host specificity protein	B8F4I8	HAPS_0587 Phage tail protein/putative Fels-1 prophage host specificity protein	P	OM
<i>HAPS_RS02905</i>	tail assembly protein	B8F4J1	HAPS_0590 Bacteriophage lambda tail assembly I	P	PP
<i>HAPS_RS02960</i>	hypothetical protein	B8F4K2	HAPS_0601 Phage protein	P	EX
<i>HAPS_RS03175</i>	ribosome-binding factor A	B8F4P5	HAPS_0648 Putative serine protease	P	EX
<i>HAPS_RS03660</i>	DNA starvation/stationary phase protection protein	B8F4Z3	dps Ferritin and DNA-binding stress protein	P	CP
<i>HAPS_RS03685</i>	superoxide dismutase	B8F4Z8	sodC Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P	PP
<i>HAPS_RS04120</i>	transporter	B8F573	comEA DNA uptake protein	P	CP
<i>HAPS_RS04845</i>	ABC transporter substrate-binding protein	B8F5L3	oppA Oligopeptide permease ABC transporter membrane protein	P	PP
<i>HAPS_RS05160</i>	arginine transporter permease subunit ArtM	B8F5S9	artM Arginine transporter permease subunit ArtM	P	IM
<i>HAPS_RS05165</i>	arginine transporter permease subunit ArtQ			P	IM
<i>HAPS_RS05325</i>	metal ABC transporter substrate-binding protein	B8F5W2	lyfeA Chelated iron ABC transporter, periplasmic-binding protein	P	PP
<i>HAPS_RS06680</i>	serine protease	B8F6K6	espP1 Putative extracellular serine protease (Autotransporter)	P	EX
<i>HAPS_RS07290</i>	anaerobic C4-dicarboxylate transporter			P	IM

Tabla 31: Listado de proteínas subexpresadas en condiciones miméticas que resultaron relacionadas con la patogenia (P) y/o localizadas en la membrana externa (OM) o extracelulares (EX). En caso de cumplir solamente uno de los criterios también se indica si no tiene relación con patogenia (NP) o si tiene otra localización diferente (IM para membrana interna, CP para citoplasma y PP para periplasma).

<i>Locus</i>	<i>Producto Genbank</i>	Número acceso Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS07420</i>	L-fuculokinase	B8F6Y1	fucK L-fuculokinase	NP	OM
<i>HAPS_RS07475</i>	ABC transporter permease			P	IM
<i>HAPS_RS07830</i>	sialidase			P	OM
<i>HAPS_RS08385</i>	ABC transporter permease	B8F7E4	rbsC2 ABC D-ribose transporter permease protein RbsC	P	IM
<i>HAPS_RS08405</i>	PTS mannose transporter subunit IID	B8F7E8	manZ PTS system mannose-specific protein IID	P	IM
<i>HAPS_RS08410</i>	PTS mannose/fructose/sorbose transporter subunit IIC	B8F7E9	manY PTS system mannose/fructose/sorbose family IIC subunit	P	IM
<i>HAPS_RS08450</i>	ATP-dependent protease	B8F7F8	comM Competence protein M	P	CP
<i>HAPS_RS08625</i>	hypothetical protein	B8F7I4	HAPS_1774 Uncharacterized protein	P	PP
<i>HAPS_RS08750</i>	reductase	B8F7K3	napD Periplasmic nitrate reductase subunit NapD	P	CP
<i>HAPS_RS09225</i>	C4-dicarboxylate ABC transporter substrate-binding protein	B8F7T5	HAPS_1899 TRAP transporter solute receptor TAXI family protein	P	PP
<i>HAPS_RS09230</i>	C4-dicarboxylate ABC transporter	B8F7T6	dctM TRAP C4-dicarboxylate transport system permease DctM subunit	P	IM
<i>HAPS_RS09770</i>	prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein	B8F829	pilA Tfp pilus assembly protein, major pilin PilA	P	EX
<i>HAPS_RS10920</i>	beta-D-galactosidase			NP	EX
<i>HAPS_RS11100</i>	hypothetical protein	B8F8R3	HAPS_2286 Uncharacterized protein	P	PP
<i>HAPS_RS11105</i>	hypothetical protein	B8F8R4	HAPS_2287 Chromosome segregation ATPase	P	EX
<i>HAPS_RS11110</i>	hypothetical protein	B8F8R5	HAPS_2288 Uncharacterized protein	P	PP
<i>HAPS_RS11115</i>	secretin	B8F8R6	comE Competence protein E/type II secretory pathway, component HofQ	P	OM

Tabla 31 (continuación): Listado de proteínas subexpresadas en condiciones miméticas que resultaron relacionadas con la patogenia (P) y/o localizadas en la membrana externa (OM) o extracelulares (EX). En caso de cumplir solamente uno de los criterios también se indica si no tiene relación con patogenia (NP) o si tiene otra localización diferente (IM para membrana interna, CP para citoplasma y PP para periplasma).

<i>Locus</i>	número acceso uniprot	Localización	Hallazgos
<i>HAPS_RS08625</i>	B8F714	PP	Homología con <i>tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein</i>
<i>HAPS_RS11100</i>	B8F8R3	PP	No se reconoció nada
<i>HAPS_RS11110</i>	B8F8R5	PP	Homología con <i>PilP family protein</i> en otra cepa de <i>H. parasuis</i>

Tabla 32: Hallazgos en proteínas subexpresadas en condiciones miméticas, relacionadas con la patogenicia, que no se encuentran caracterizadas ni en la base de datos del *Genbank* ni en la de Uniprot.

5. DISCUSIÓN

5.1. VALORACIÓN DE TRES PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE LA CEPA NAGASAKI DE *Haemophilus parasuis* COMO ANTÍGENOS VACUNALES CONTRA LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER EN CERDOS

5.1.1. Estudio de las secuencias aminoacídicas de las tres proteínas y selección del fragmento génico que clonar

Con el fin de seleccionar una zona adecuada en cada proteína para su clonación y expresión posterior, se realizó un estudio preliminar con herramientas bioinformáticas. Esta aproximación permitió conocer las zonas que presentaban una mayor probabilidad de contener epítomos accesibles al sistema inmunitario del hospedador y, además, comparar el grado de similitud con la cepa SH0165 (también del serotipo 5, como la Nagasaki utilizada en el presente estudio), en la que previamente habían sido caracterizadas inmunogénicamente estas proteínas empleando ratones (Zhou *et al.*, 2009a).

En el caso de la proteína P2, los resultados mostraron que prácticamente toda ella se encontraba compuesta por un barril β que presentaba ocho lazos extracelulares. Por el contrario, en la P5 el dominio barril β quedaba restringido a los dos tercios más próximos al extremo N-terminal, prediciéndose en el tercio restante un dominio proyectado hacia el espacio periplásmico. El número total de lazos extracelulares observado en la P5 fue de cinco. Como era de esperar, este dato concordó con el estudio de secuencias para estas dos proteínas llevado a cabo previamente por Mullins *et al.* (2009). Teniendo en cuenta el pequeño tamaño relativo de estas dos proteínas, se optó por clonar el gen completo, excepción hecha de la porción que codificaba el péptido señal.

El estudio de la secuencia de la proteína D15 permitió conocer que la mitad N-terminal presentaba una repetición en tándem del dominio POTRA (*polypeptide-transport-associated domain*), el cual posee una orientación periplásmica (Fleming *et al.*, 2016). En la mitad C-terminal se predijo un barril β con diez lazos extracelulares. Debido a que esta proteína presenta un tamaño mayor que las anteriores, se optó por seleccionar la zona C-terminal para clonar su porción de gen y realizar los estudios posteriores.

La comparación entre las secuencias de las cepas Nagasaki y SH0165 permitió conocer que, tanto en la proteína P2 como en la P5, existen diferencias en los lazos extracelulares de los barriles β , únicos lugares de estas proteínas que son accesibles al sistema inmunitario cuando éstas se localizan en la membrana externa de la bacteria. Debido a esto, antes de proceder a su investigación directa en el modelo porcino, se prefirió efectuar una caracterización inmunogénica en un modelo animal más manejable, como es el conejo. Este ensayo se realizó también con la D15 porque, si bien resultó ser prácticamente idéntica entre ambas cepas, la región seleccionada en nuestro caso contenía más lazos extracelulares que la región estudiada en el trabajo anteriormente citado (Zhou *et al.*, 2009a).

5.1.2. Producción de proteínas recombinantes de la membrana externa

Se consiguió clonar en *E. coli* los fragmentos seleccionados de los genes que codificaban las tres proteínas de la cepa Nagasaki. De las proteínas P2 y P5 se clonó toda su longitud excepto una pequeña porción N-terminal responsable de la codificación del péptido señal. La secuenciación de ambos fragmentos génicos y el posterior alineamiento con las dos secuencias previamente publicadas para la cepa Nagasaki (Mullins *et al.*, 2009), permitió observar que, en el caso de la proteína P5, la secuencia nucleotídica resultante era exactamente igual a la publicada, mientras que la P2 presentaba una única sustitución puntual que, gracias a la degeneración del código genético, no modificaba la secuencia aminoacídica final.

En el caso de la proteína D15, al carecer de secuencia de referencia para la cepa Nagasaki, se comparó con la secuencia publicada para la cepa SH0165, del mismo serotipo (Yue *et al.*, 2009). Curiosamente, la región del gen clonada por nosotros en la cepa Nagasaki resultó idéntica a la secuencia nucleotídica publicada para la cepa SH0165. Esto contrastó con lo observado previamente para las proteínas P2 y P5 en el estudio preliminar de secuencias en el que, al comparar las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas entre la cepa Nagasaki y la cepa SH0165, pudimos encontrar diversas diferencias.

Las tres proteínas fueron extraídas en la fracción proteica insoluble, lo cual indicó que su sobreexpresión dio lugar a la formación de cuerpos de inclusión, circunstancia bastante común al utilizar *E. coli* como sistema de expresión (Yang *et al.*,

2011). Como el proceso de extracción de proteínas insolubles conlleva una solubilización por desnaturalización proteica, fue necesario aplicar posteriormente un proceso de renaturalización. En nuestro caso, para la extracción se utilizó un tampón con urea como agente desnaturalizante. Para la renaturalización, debido a que nuestras proteínas recombinantes portaban una etiqueta de histidina, se optó por realizar una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) en un gel de Ni-histidina, que permitió inmovilizar las proteínas para, mediante lavados con tampones de concentración decreciente de urea, disminuir progresivamente dicho agente desnaturalizante hasta su eliminación completa. Además, este proceso permitió realizar la purificación proteica en paralelo puesto que, los mismos lavados destinados a la eliminación de la urea, sirvieron para eliminar las proteínas unidas a la resina de forma no específica.

Por último, mediante ELISA y *Western blott* se comprobó que las proteínas purificadas eran reconocidas por sueros de cerdos previamente expuestos a la bacteria.

5.1.3. Valoración de la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes en conejos

Aunque las tres proteínas ya habían sido estudiadas en un modelo murino (Zhou *et al.*, 2009a), teniendo en cuenta las diferencias de secuencia observadas para la P2 y P5 entre nuestra cepa y la caracterizada en ratones (SH0165), así como el hecho de que el fragmento de la D15 seleccionado por nosotros comprendía varios lazos extracelulares no estudiados en la prueba anterior, consideramos oportuno que, antes de valorar su capacidad protectora en cerdos, debíamos estudiar su inmunogenicidad en un modelo animal más manejable, como el conejo.

Los resultados mostraron que las tres proteínas fueron capaces de inducir la producción de anticuerpos específicos capaces de reconocer la bacteria. De esto último se desprende que las proteínas recombinantes, a pesar del proceso de desnaturalización-renaturalización sufrido, mantuvieron epítomos conformacionales propios de su estado nativo y que, además, esos epítomos se localizaban en las zonas de las proteínas expuestas en la superficie bacteriana, por lo tanto, accesibles *a priori* al sistema inmunitario.

5.1.4. Valoración de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes frente a *Haemophilus parasuis* en un modelo porcino

5.1.4.1. Desarrollo de la infección experimental

La enfermedad de Glässer cursa con un cuadro séptico en el que el hallazgo anatomopatológico más común consiste en la presencia de poliserositis fibrinopurulenta, aunque en algunos casos se ha descrito una septicemia fulminante, sin presencia de serositis y con lesiones poco relevantes, del tipo de pequeños depósitos de fibrina en la cavidad abdominal (Hoefling, 1994).

En cinco de los animales de nuestro estudio, dos controles sin inmunizar y tres inmunizados con alguna de las proteínas recombinantes, la sintomatología fue tan grave que, antes de transcurridas 12 horas, se optó por su eutanasia para evitar su sufrimiento. Las lesiones en estos cinco cerdos, de estar presentes, fueron menos destacadas que en el resto de enfermos, consistiendo en la presencia de congestión, además de apreciarse hidropericardio en algún caso o una pequeña cantidad de fibrina en algún órgano. El cuadro presentado por aquellos en los que se no se apreció serositis podría ser clasificado como perteneciente a la forma septicémica fulminante, sin poliserositis, descrita por Peet *et al.* (1983). Por el contrario, en los que se apreció hidropericardio se debería asociar con la forma clásica de la enfermedad de Glässer con poliserositis, presentada en estos casos con una mayor gravedad, de forma que no hubiera dado tiempo a que las lesiones se hicieran muy evidentes. Podríamos preguntarnos si la forma septicémica fulminante previamente mencionada no es más que un cuadro séptico en el que la aparición más temprana de un shock seguido de la muerte imposibilita la aparición de poliserositis. En cualquier caso, se prefirió omitir los datos de estos cinco animales a la hora de comparar las lesiones halladas en los diferentes grupos experimentales, para evitar subestimar el alcance de las lesiones.

En el resto de cerdos controles o inmunizados con proteínas recombinantes, el cuadro, aunque también agudo, fue menos rápido, con la presencia en todos ellos de síntomas inespecíficos a las 12 horas de la infección, como resulta habitual en *H. parasuis* (Nedbalcova *et al.*, 2006), del tipo de disnea e hipertermia. Dichos síntomas fueron empeorando progresivamente durante las 36 horas siguientes, con la aparición de postración, cojeras y depresión de la actividad, lo cual determinó la eutanasia paulatina

de todos los animales controles e inmunizados con alguna o las tres proteínas recombinantes, antes de cumplirse las 48 horas posteriores al desafío. El desarrollo de la enfermedad observado en estos animales fue muy similar a lo descrito en otras infecciones experimentales llevadas a cabo con la misma cepa por vía intratraqueal. Sirva de ejemplo lo observado por Amano *et al.* (1997) cuando inocularon dosis de 10^5 , 10^6 y 10^7 UFCs de cepa Nagasaki a cerdos SPF y observaron hipertermia a partir de las 16 horas de la infección; disnea y postración, a partir de las 24 horas y muerte de todos los animales entre las 28 y 48 horas después de la infección. No obstante, en nuestro caso se apreció una gravedad ligeramente mayor, que podría justificarse por la circunstancia de haber utilizado una dosis infecciosa más elevada (10^8 UFCs) durante el desafío.

En todos los animales fallecidos entre las 12 y 48 horas posteriores a la infección se observaron las lesiones características de la enfermedad de Glässer: poliserositis con presencia de exudado (con o sin fibrina), con diferente gravedad y número de serosas implicadas; además, también se comprobó la afección de órganos linfoides, como el bazo y los ganglios linfáticos de localización torácica.

En los animales sometidos a estudio histopatológico pertenecientes al grupo control sin inmunizar y a los grupos de inmunizados con las tres proteínas recombinantes, se advirtieron diferentes grados de afectación de las meninges, pleura, pulmón y bazo.

En algunos de los animales se apreciaron áreas con neumonía tanto macroscópica como microscópicamente. En este sentido, *H. parasuis* generalmente se encuentra implicado en el desarrollo de neumonías como agente secundario a otros patógenos y muy rara vez como agente primario (Hoefling, 1994); sin embargo, no debe extrañar que en nuestro caso se trate de un agente primario debido a que previamente ya se ha descrito este hecho como una circunstancia común cuando se realiza una inoculación intratraqueal con dosis infecciosas elevadas (Amano *et al.*, 1997).

Teniendo en cuenta la recuperación del microorganismo a partir de los órganos muestreados, se puede afirmar que en todos los animales del grupo control no inmunizado y del grupo inmunizado con alguna de las proteínas (o las tres), independientemente del momento del fallecimiento, se produjo una diseminación sistémica de la bacteria, puesto que en todos ellos se consiguió aislar *H. parasuis*, por lo menos en una de las localizaciones muestreadas diferentes al pulmón.

El análisis mediante PCR en tiempo real de la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta inmunitaria volvió a poner en evidencia la falta de protección conferida por nuestras proteínas, puesto que no se apreciaron diferencias significativas para la expresión de dichos genes entre los animales desafiados no vacunados y los animales vacunados con las tres proteínas, a diferencia de lo observado por nuestro grupo en estudios previos donde se demostraba que varios de esos genes (codificantes de IL-1, IL6, IL8, CD163 o CD14) resultaban expresados diferencialmente al emplear formas vacunales que otorgaban protección (Martinez-Martinez *et al.*, 2016).

En contra de lo que hubiésemos esperado, debemos afirmar que las tres proteínas estudiadas no aportaron protección frente a la cepa Nagasaki de *H. parasuis* en las condiciones de nuestro estudio. Esto se deduce al no haberse apreciado diferencias en cuanto a sintomatología, supervivencia, cuadro lesional o recuperación de la bacteria entre los diferentes grupos inmunizados con alguna de las proteínas de estudio y el grupo control no inmunizado.

Por el contrario, todos los animales inmunizados con la bacteria comercial sobrevivieron, mostrando únicamente una ligera sintomatología durante los primeros días y, en algún caso, alguna leve lesión durante la necropsia. En ninguno de ellos se consiguió aislar la bacteria a partir de sus órganos. Este grupo, que sirvió como control positivo de protección vacunal, puso de manifiesto, más si cabe aún, la falta de protección otorgada por nuestras proteínas.

5.1.4.2. Respuesta inmune humoral

Centrándonos en la respuesta humoral, se observó que las proteínas fueron capaces de inducir en los cerdos la producción de IgGs específicas, que además eran capaces de reconocer a la bacteria, como se desprende de los resultados obtenidos en los ELISAs indirectos. En ninguno de los dos grupos controles no inmunizados (desafiados o no desafiados) se observó un incremento significativo de los valores de densidad óptica durante los diferentes momentos del experimento con respecto al instante inicial. En cambio, en los animales inmunizados con cualquiera de las proteínas recombinantes, o con las tres en conjunto, se apreció un incremento significativo a partir de la primera inmunización en las placas tapizadas con proteína y a partir de la segunda, en las placas tapizadas con la bacteria, si bien en este último caso, con independencia del grupo

experimental, el incremento, aunque significativo, fue menos evidente que al tapizar con la proteína.

Por último, coincidiendo con lo que habíamos observado previamente al realizar los ELISAs con placas tapizadas con nuestras proteínas y sueros de pruebas experimentales anteriores, los cerdos inmunizados con la bacterina comercial de la presente prueba nuevamente fueron capaces de reconocer las proteínas mediante ELISA. En este caso, comprobamos que después de la primera inmunización ya se producía un cambio estadísticamente significativo en los niveles de IgGs específicas frente a la proteína P5, mientras que para las proteínas P2 y la D15 hubo que esperar hasta la realización de la segunda inmunización, siendo además menos pronunciados los incrementos de densidad óptica con respecto al instante inicial. Esto concuerda con lo observado para las proteínas P5 y D15 por Olvera *et al.* (2010) en un estudio previo. En este trabajo mediante MALDI-TOFF, sus autores detectaron las bandas correspondientes a las proteínas P5 y D15 (la P2 no fue estudiada) entre un extracto de OMPs de *H. parasuis*. Mediante *immunoblotting* enfrentaron dicho extracto con sueros procedentes de cerdos desafiados con una dosis subletal de cepa Nagasaki o de cerdos inmunizados con una bacterina, para valorar el reconocimiento por ellos de ambas proteínas. Determinaron que la P5 se detectaba a partir del día 22 de la exposición mientras que la D15, tras 22 días solo era detectada por la mitad de los animales inmunizados y por ninguno de los infectados, teniendo que transcurrir entre los 27 y 42 días posteriores a la exposición para que el 50 % de los cerdos infectados con una dosis subclínica y la totalidad de cerdos inmunizados con la bacterina fueran capaces de reconocerla. Esto les llevó a definir a la proteína P5 como un antígeno temprano y a la D15 como un antígeno tardío.

En nuestro caso, el sangrado tras la primera inmunización se llevó a cabo a los 21 días, momento en el cual ya se detectaron IgGs frente a la proteína P5, mientras que el segundo sangrado se practicó a los 39 días de la primera inmunización (17 tras la segunda) y fue a partir de ese momento cuando se comenzaron a detectar anticuerpos específicos para la D15. Este hecho solo se observó al emplear sueros de animales inmunizados con la bacterina, ya que cuando se utilizaban sueros de animales inmunizados con cualquiera de las tres proteínas ya se detectaban anticuerpos específicos frente a esa proteína tras la primera inmunización, o lo que es lo mismo, 21 días después.

Independientemente de los resultados observados en los ELISAs, quedó claro que la producción de IgGs específicas no bastó para proteger a los animales frente a la infección experimental llevada a cabo en este trabajo.

5.1.5. Posibles interpretaciones

El objetivo de este trabajo se basaba en el estudio de la capacidad protectora en el hospedador natural de estas tres proteínas, que previamente habían mostrado cierto grado de protección en un modelo murino (Ahn *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2009a). Conviene aclarar que éramos conscientes de la dificultad de obtener una protección total, puesto que ésta solo se había observado en contadas ocasiones en lo que a vacunas de subunidades probadas en cerdos frente a *H. parasuis* se refiere. De hecho, salvo una excepción (TbpB mutante que veremos más adelante), las subunidades que han sido capaces de inducir una protección total han sido formulaciones que portaban un gran número de proteínas, como sucede con las vesículas de membrana externa (OMVs) y con las OMPs con afinidad por la transferrina porcina. Las OMVs han sido estudiadas recientemente por McCaig *et al.* (2016) y dichas estructuras portaban hasta 78 proteínas diferentes, mientras que las OMPs con afinidad por la transferrina porcina han sido estudiadas por nuestro grupo en el pasado reciente (Frاندoloso *et al.*, 2011b) y comprendían una fracción de hasta ocho proteínas diferentes de *H. parasuis*.

Más bien la idea del presente estudio consistió en valorar el porcentaje de supervivencia otorgado por cada proteína, con el objeto de que esta información, junto con la de otras investigaciones en las que se demostró protección parcial de otras OMPs, permitiese en un futuro el diseño de vacunas en las que se combinaran diferentes proteínas que, en conjunto, pudieran aportar un elevado grado de protección sin la necesidad de utilizar bacterinas, debido a sus desventajas ya mencionadas anteriormente.

Sin embargo, en el caso de las tres proteínas seleccionadas, la protección resultó nula, por lo menos con la cantidad de proteína inoculada y con la dosis de desafío empleada. Para explicar el motivo de esta falta de protección podríamos apelar a una escasa exposición de los epítomos al exterior bacteriano, como se desprende de su estudio estructural (Mullins *et al.*, 2009), ya que, al tratarse de proteínas formadas prácticamente en su totalidad por un barril β , en el caso de la P2, o por un barril β unido a otros motivos orientados hacia el espacio periplásmico, como sucede con las proteínas P5 y D15,

implicaría que los únicos epítomos expuestos al exterior y, por lo tanto, capaces de ser reconocidos por el sistema inmunitario, serían solamente aquellos localizados en los lazos extracelulares de los barriles β . Al ser una pequeña porción de cada proteína la que queda expuesta a las células que inician la respuesta inmune, la diversidad de epítomos útiles de cada una será mucho menor que la de cualquier otra proteína que presente una gran superficie expuesta.

Podríamos especular también con la idea de que, a pesar de que nuestras proteínas recombinantes indujeron la producción de anticuerpos capaces de unirse a epítomos de las mismas proteínas localizadas de forma nativa sobre la bacteria, como se desprende de su reconocimiento mediante ELISA, el número total de dichos epítomos no resultase suficientemente elevado como para que su interacción con los anticuerpos específicos fuera suficiente para proteger contra la dosis infecciosa empleada. Sirva como ejemplo de lo anterior lo observado para la proteína TbpB nativa estudiada previamente por nuestro grupo para la cepa Nagasaki (Frاندoloso *et al.*, 2011b). Dicha proteína presenta dos barriles β localizados en la superficie celular en vez de situarse embebidos en la membrana externa como en el caso de las proteínas seleccionadas por nosotros (Noinaj *et al.*, 2012), por lo que es de esperar que presente una mayor número de epítomos capaces de ser reconocidos por anticuerpos que los que presentaría de encontrarse insertada completamente en la membrana. Al ser probada dicha proteína en el cerdo confirió cierto grado de protección frente a la bacteria, aunque no completa (Frاندoloso *et al.*, 2011b). Sin embargo, al inducirle una mutación en su secuencia se consiguió un grado de protección total, debido a que dicha mutación estuvo dirigida al lugar de unión a la transferrina porcina, por lo que la proteína recombinante no se unía a dicha proteína del hospedador y no ocultaba parte de su superficie (Frاندoloso *et al.*, 2015a). A día de hoy, esta construcción mutante representa la única proteína de *H. parasuis* capaz de inducir en solitario una protección totalmente eficaz contra la infección experimentalmente con el mismo serotipo.

Como otros ejemplos de proteínas concretas capaces de inducir cierto grado de protección en cerdos, aunque no completa, es preciso citar las VtaAs (Olvera *et al.*, 2011), o la OapA y GAPDH (Fu *et al.*, 2013). Las VtaAs (*virulence-associated trimeric autotransporter*) son un grupo de proteínas con función de adhesina, pertenecientes a la familia de las TAAs (*trimeric autotransporter adhesins*), que son proteínas con un dominio de anclaje a la membrana y una larga porción extracelular constituida por un

tallos y una cabeza que interactúan durante la adhesión con las células del hospedador (Szczeny & Lupas, 2008). En un estudio de Olvera *et al.* (2011) se expresaron las regiones extracelulares de seis VtaAs y se valoró la protección otorgada por el conjunto de estas seis proteínas frente a una infección intranasal con la cepa Nagasaki, encontrándose una protección variable en función de la dosis infecciosa empleada, aproximadamente de la mitad de supervivencia frente a 10^6 UFCs y de un tercio si se desafiaba con 10^8 UFCs. En este caso, nos encontramos ante una combinación de seis grandes fracciones proteicas (entre 800 aminoácidos la más pequeña y 2.000 aminoácidos la más grande) completamente extracelulares, que aportan una protección parcial frente al desafío por vía intranasal. Esta gran cantidad de superficie expuesta nuevamente contrastaría con nuestras proteínas, de entre 300 y 460 aminoácidos, de los que solo una fracción se encuentra en los lazos extracelulares expuestos al exterior.

En el caso de las proteínas GPDH y OapA, Fu *et al.* (2013) describieron una supervivencia en torno al 70 y 50%, respectivamente, cuando los cerdos inmunizados con ellas eran desafiados intranasalmente. La OapA presenta un extremo C-terminal de unos 200 aminoácidos orientado al exterior. La GAPDH, a pesar de su nombre (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), que haría sospechar de una localización citosólica, parece que presenta paralelamente una función de adhesina, con su correspondiente buena disposición en la superficie de la célula (Henderson *et al.*, 2006).

Otra posible explicación para la falta de protección observada para estas proteínas en comparación con otras, que podría ser compatible con el bajo número de epítomos “útiles”, sería la vía de inoculación empleada durante el desafío. En este trabajo, basándonos en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo, se seleccionó una dosis del rango de 10^8 UFC por animal, administrada por vía intratraqueal, ya que previamente se ha demostrado que esta dosis de cepa Nagasaki y por esa vía, resultaba suficiente como para producir un 100% de mortalidad en animales no inmunizados, pero a su vez permitía la valoración de la protección, total o parcial, de diferentes subunidades, como se desprende de los estudios realizados con respecto a la TbpA, a la TbpB salvaje, a las proteínas de membrana con afinidad por la transferrina porcina (Frndoloso *et al.*, 2011b) o a la TbpB mutante (Frndoloso *et al.*, 2015a).

La ruta de desafío intranasal con *H. parasuis* es menos eficaz que la ruta intratraqueal a la hora de desencadenar una septicemia aguda mortal o una neumonía experimental, por lo que se precisa una dosis infecciosa mayor, seguramente debido a

que, al inocular directamente en tráquea, se evitan los sistemas defensivos de mucosas del aparato respiratorio superior (Amano *et al.*, 1997); de hecho, por vía intranasal no se puede garantizar la muerte de todos los animales desafiados. Esto no evita que se emplee en la valoración de la eficacia protectora de inmunógenos como, por ejemplo, en las valoraciones de las OMVs, vtaAs, GAPDH y OapA descritas antes. En el estudio de las OMVs, la dosis intranasal empleada (10^8 UFC) fue insuficiente para inducir la muerte en la totalidad de los animales control no inmunizados (McCaig *et al.*, 2016). Debido a que nuestras proteínas recombinantes no fueron capaces de mostrar protección al realizar un desafío intratraqueal, surge la duda de qué habría ocurrido de haber empleado la misma dosis pero con una vía de inoculación intranasal o, por el contrario, una vía intratraqueal con una dosis menor. Sobre esto nada más podemos hacer que teorizar.

A pesar de todo lo anterior, las proteínas de este estudio fueron capaces de inducir cierto grado de protección en un modelo de ratón (Zhou *et al.*, 2009^a ; Ahn *et al.*, 2012). Sobre ello podemos indicar que el ratón no representa el hospedador natural, ya que *H. parasuis* solo se aísla de forma natural en el cerdo y jabalí (Aragón *et al.*, 2010) y que además, aunque con una dosis adecuada de bacteria se consiga matar ratones por vía intraperitoneal, normalmente no se suele inducir poliserositis (Morozumi *et al.*, 1982).

El modelo murino se viene utilizando como primera aproximación experimental, debido a su fácil manejo y a que, algunas proteínas que previamente habían mostrado un cierto grado de protección en ratón también lo consiguieron posteriormente en cerdo (Fu *et al.*, 2013). Sin embargo, se trata de un modelo imperfecto porque ni reproduce la infección de forma natural, que solo se desencadena en el cerdo y el jabalí (Aragón *et al.*, 2010), ni la enfermedad porque, aunque con una dosis elevada de la bacteria por vía intraperitoneal se consiga un efecto letal en ratones, no suele inducir poliserositis (Morozumi *et al.*, 1982). Dicho de otro modo, las cepas virulentas de *H. parasuis* se han seleccionado evolutivamente para infectar y provocar la enfermedad en el cerdo, mientras que en condiciones naturales no son infectivas en ratón. Teniendo en cuenta esto, pensamos que una posible explicación de porqué estas proteínas, que previamente habían mostrado cierto grado de protección parcial en ratón, no fueron capaces de proteger en cerdo podría deberse nuevamente a la limitada disposición de epítomos en la superficie bacteriana. Si esta escasa disposición en superficie, se traduce en que estas proteínas son poco accesibles al sistema inmunitario y por lo tanto la respuesta inmune inducida por ellas no es muy potente, cabría preguntarse si aun así, esta poco potente respuesta inmune

es capaz de evidenciarse en un modelo animal (ratón), que ya de por sí es resistente a la bacteria (y solo con dosis muy elevadas de infección se puede conseguirse un efecto letal), mientras que al utilizar un modelo animal totalmente susceptible (cerdo privado de calostro) dicha respuesta inmunitaria no sea capaz de proteger frente a la inoculación de la bacteria con la dosis y vía de administración seleccionadas.

5.2. ESTUDIO DE RECEPTORES RELACIONADOS CON LA SEPSIS SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN CERDOS INFECTADOS CON *Haemophilus parasuis*

5.2.1. Presencia de sepsis en los animales

Los animales seleccionados para esta prueba fueron diez cerdos procedentes de la infección experimental y pertenecientes al grupo de cerdos no inmunizados. Los animales del mismo grupo que debieron eutanasiarse antes de cumplirse 24 horas después de la infección fueron descartados. En el momento de la extracción sanguínea a las 24 horas después de la infección, todos los animales presentaban hipertermia, postración y disnea. De hecho, la sintomatología resultó tan grave, que todos debieron ser eutanasiados dentro de las 24 horas siguientes para evitar su sufrimiento. En todos los animales se consiguió aislar *H. parasuis* en tres o más localizaciones diferentes del pulmón, lo cual resultó indicativo de la diseminación sistémica de la bacteria. Además, las lesiones observadas tras las necropsias demostraron que, en mayor o menor medida, todos los cerdos mostraban las lesiones propias de la enfermedad de Glässer. Por todo ello, podemos afirmar que, en el momento de la toma de muestras sanguíneas posterior al desafío, los diez animales utilizados en este estudio padecían un proceso séptico causado por *H. parasuis*.

5.2.2. Dobles marcajes con anti-CD172a

Como ya se expuso en el apartado de material y métodos, de forma preliminar se realizaron dobles marcajes en tres de los animales combinando CD172a con TLR-2, TLR-4, Siglec-1, Siglec-3, Siglec-5, Siglec-10 y CD163, con el propósito de conocer la variación, como resultado de la infección, de los niveles de expresión de estos marcadores en monocitos (definidos en este doble marcaje como eventos CD172a^{hi} en una región SSC/FSC propia de monocitos) o linfocitos (definidos como eventos CD172a⁻ en una región SSC/FSC propia de linfocitos). En función de lo observado en estos marcajes se establecerían las combinaciones de marcajes posteriores.

Los primeros resultados con anti-CD172a mostraron que la gran mayoría de los monocitos porcinos resultaron positivos para los receptores TLR-2, Siglec-3 y Siglec-5, datos que concuerdan con los resultados de investigaciones anteriores, en los que se

caracterizaron estos marcadores en porcino y se desarrollaron los anticuerpos monoclonales específicos utilizados en este estudio: TLR-2 (Álvarez *et al.*, 2008), Siglec-3 (Álvarez *et al.*, 2015) y Siglec-5 (Escalona *et al.*, 2014).

Igualmente, los resultados del estudio sobre la caracterización de TLR-2 porcino, coinciden también con lo observado por nosotros sobre la ausencia de expresión de este receptor en los linfocitos porcinos, definidos en este trabajo como eventos CD172a⁻ procedentes de una región SSC/FSC propia de linfocitos. No obstante, en el caso de los estudios previos sobre la caracterización de los receptores Siglec-3 (Álvarez *et al.*, 2015) y Siglec-5 (Escalona *et al.*, 2014) porcinos, se encontró un porcentaje de linfocitos B con bajos niveles de expresión para ambos, que no pudo ser observado en la subpoblación de linfocitos totales de nuestra investigación, lo que podría deberse a que en nuestro análisis se trabajó con linfocitos totales (CD172a⁻), sin discernir entre linfocitos T, B o células NK, por lo que la gran mayoría de eventos negativos para Siglec-3 o Siglec 5 presentes en la subpoblación CD172a⁻ pudo enmascarar el pequeño porcentaje de linfocitos B con baja expresión, de manera que no se pudieran distinguir de la señal negativa.

Con respecto a TLR-4, la inmensa mayoría de los monocitos resultaron positivos, aunque también se observaron pequeños porcentajes positivos para este marcador en eventos de las subpoblaciones CD172a⁻ (linfocitos) y CD172a^{+low}. Sin embargo, para estas dos subpoblaciones no se pudo establecer una relación entre el momento anterior y posterior al desafío, ni en el porcentaje de eventos positivos ni en la intensidad de expresión. Los estudios previos sobre la expresión de TLR-4 en PBMCs se realizaron mediante PCR cuantitativa y mostraron una expresión variable en los monocitos y PBMCs totales (Álvarez *et al.*, 2006), por lo que en principio no contradicen los resultados obtenidos por nosotros.

En el caso de CD163, como era de esperar según lo comprobado en estudios anteriores (Pérez *et al.*, 2008), solo se expresó en monocitos, apareciendo tanto células positivas como negativas para ese marcador. El porcentaje de monocitos CD163⁺ se incrementó en los tres animales, aunque solo ligeramente en dos de ellos, sin resultar estadísticamente significativo.

También encontramos un porcentaje variable de monocitos positivos para el receptor Siglec-1 en los tres cerdos, apreciándose en todos ellos un descenso acusado del porcentaje de monocitos positivos para Siglec-1 a las 24 horas de la infección, aunque no

resultó estadísticamente significativo, debido seguramente al pequeño tamaño de la muestra. Un hecho curioso de nuestro estudio que queremos destacar fue la presencia de monocitos porcinos positivos para este marcador, dato que contrasta con otros resultados publicados en el pasado, en los que la expresión de dicho marcador se restringía a subpoblaciones de macrófagos tisulares o a células dendríticas derivadas a partir de monocitos por cultivo *in vitro*, sin aparecer en monocitos circulantes (Revilla *et al.*, 2009). Sin embargo, conviene aclarar que estos estudios fueron realizados en cerdos adultos, mientras que en otros estudios más recientes realizados por el mismo grupo de investigación se comprobó que también existía expresión de Siglec-1 sobre monocitos cuando éstos procedían de cerdos de pocas semanas de vida (Revilla *et al.*, datos no publicados). Por lo tanto, nuestros resultados podrían justificarse por la edad de los animales utilizados, nueve semanas y media. A diferencia de los cerdos adultos, en nuestros animales se observó un porcentaje de monocitos positivos para este marcador, aunque no en la totalidad de los monocitos, como ocurre en los animales muy jóvenes.

Para el receptor Siglec-10, los estudios previos (Escalona *et al.*, 2015) mostraron que su expresión porcina se restringía a los linfocitos B y, de forma variable, a los monocitos. En nuestro caso, centrándonos en la región SSC/FSC propia de linfocitos, encontramos un destacado porcentaje de eventos CD172⁺ que eran positivos para este marcador, por lo que podríamos asumir que se trataba de linfocitos B. No se pudo establecer diferencias entre los momentos previo y posterior al desafío para Siglec-10 ni a nivel de intensidad de expresión sobre la superficie de linfocitos positivos, ni a nivel de porcentajes de células positivas sobre los linfocitos totales. Con respecto a los monocitos, a diferencia de lo observado cuando se caracterizó el anticuerpo monoclonal específico, nuestros resultados mostraron que, en nuestros animales no se expresaba Siglec-10 en esta población, ni antes ni después de la infección.

Para TLR-2 y Siglec-3 se observó que en los tres animales aumentaban sus niveles de expresión sobre monocitos después del desafío, y además estos incrementos resultaban estadísticamente significativos. En el caso de CD163, aunque se apreció un aumento de su expresión en monocitos tras el desafío en los tres cerdos, los cambios no resultaron estadísticamente significativos. Conviene advertir que el incremento de CD163 observado en uno de los animales, aunque destacado, fue bastante menos acusado que el observado en los otros dos, lo que, junto al pequeño tamaño de la muestra, podría explicar la ausencia de significación estadística. Por último, lo observado en estos dobles marcajes

para los receptores Siglec-5 y TLR-4 no resultó esclarecedor. En ambos marcadores no se pudo establecer una tendencia con respecto a cambios de intensidad de expresión en monocitos, como consecuencia de la infección.

Una vez analizados estos resultados, se optó por efectuar nuevos dobles marcajes combinando los anticuerpos específicos para TLR-2, TLR-4, Siglec-1, Siglec-3 y Siglec-5 con anti-CD163 en seis animales (cinco en el caso de Siglec-1) para, por una lado, confirmar o aclarar las tendencias de expresión vistas con en los dobles marcajes realizados con anti-CD172a y, por otro, valorar cómo se comportaban dichos marcadores en las subpoblaciones de monocitos CD163⁺ y CD163⁻. Además, se realizaron otros dobles marcajes en tres cerdos, enfrentando los marcadores anteriores con el anticuerpo monoclonal 6D10, específico de granulocitos.

5.2.3. Dobles marcajes con el anticuerpo monoclonal 6D10

Como se comentó en el apartado de resultados, es posible que en algunos casos se arrastrase una pequeña contaminación por granulocitos durante el aislamiento de los PBMCs, la cual podría esperarse que fuese mayor tras el desafío. Los granulocitos son células CD172a^{hi} y CD163⁻, por lo que, este doble marcaje se realizó con el objetivo de descartar que los cambios observados previamente sobre los eventos CD172a^{hi}, o los que se esperaban observar en los eventos CD163⁻, con respecto a TLR-2, Siglec-3 o Siglec-5, cuya expresión se encuentra descrita también en granulocitos, pudieran estar sesgados por diferencias en la proporción de granulocitos contaminantes entre antes y después del desafío. Los resultados confirmaron que las tendencias detectadas previamente en los monocitos (con anti-CD172a) o paralelamente en los monocitos CD163⁻, con respecto a la expresión de TLR-2, TLR-4, Siglec-3 y Siglec-5, se repetían en los eventos 6D10⁻ presentes en una región SSC/FSC característica de monocitos. Además, se comprobó que, en los tres animales y en ambos momentos, había muy poca contaminación por eventos 6D10⁺.

5.2.4. Dobles marcajes con anti-CD163

Los resultados en los dobles marcajes con anti-CD163, efectuados en este caso con el doble de animales, permitieron dar mayor robustez a los hallazgos anteriores. Con respecto a los valores de expresión de CD163 sobre monocitos, se comprobó que después de la infección se producía un incremento considerable en los seis cerdos estudiados y, además, las diferencias de expresión entre ambos momentos resultaron estadísticamente significativas.

En el caso del receptor TLR-2, también se observó en los seis animales un incremento tras la infección en la expresión de este marcador, tanto sobre monocitos CD163⁺ como CD163⁻. En ambas subpoblaciones, al comparar sus niveles de expresión para TLR-2 antes y después, se observaron diferencias significativas. Además, se apreció que el incremento de la expresión de TLR-2 resultaba significativamente más pronunciado en los monocitos CD163⁺ que en los CD163⁻, intuyéndose tras la infección una relación de una mayor expresión de TLR-2 cuanto mayor fuera la expresión de CD163.

Los resultados con Siglec-3 fueron prácticamente idénticos a los observados para TLR-2, es decir, un incremento significativo de su expresión tras el desafío, tanto en monocitos CD163⁺ como CD163⁻, siendo significativamente más exagerado en la primera subpoblación y, de la misma manera, apreciándose una relación de mayor expresión de Siglec-3 cuanto mayor expresión se produjera de CD163. La única diferencia consistió en que uno de los cerdos mostró un ligero descenso de expresión de Siglec-3 en los monocitos CD163⁻ después del desafío. En TLR-4 no se observaron diferencias significativas entre antes y después del desafío en los monocitos CD163⁺ ni en los CD163⁻, si bien es cierto que en cinco de los seis cerdos se produjo un ligero descenso de la expresión tras la infección, tanto en los eventos CD163⁺ como en los CD163⁻.

Con respecto a Siglec-5, al igual que lo observado en el doble marcaje con CD172a, a pesar de haber utilizado el doble de animales, no se pudo establecer una tendencia clara, ya que aparecieron tanto animales cuya expresión aumentaba como otros en los que descendía o permanecía con niveles similares. Lo único que podemos afirmar es que no se apreciaron diferencias significativas en los niveles de expresión de este marcador sobre monocitos entre antes y después del desafío, independientemente de que las células fuesen CD163⁺ o CD163⁻. Y tampoco pareció haber diferencias entre los

niveles de expresión de Siglec-5 de las dos subpoblaciones de monocitos en cualquiera de los dos momentos.

En el caso de Siglec-1 volvimos a confirmar su presencia sobre monocitos, en un porcentaje variable, en los cinco animales utilizados. Cabe comentar que resultó curiosa la desaparición tras el desafío de una pequeña subpoblación CD163⁻/Siglec-1⁺ observada antes de la infección. En los monocitos CD163⁺ no se observaron diferencias significativas en la intensidad de expresión de Siglec-1 entre ambos momentos comparados.

5.2.5. Posibles interpretaciones

Lo primero que nos llamó la atención de los resultados obtenidos fueron las tendencias diferentes observadas para TLR-2 y TLR-4 en monocitos, pues mientras la expresión del primero de los receptores se incrementó significativamente después del desafío, en el segundo no se observaron cambios significativos entre ambos momentos. Un estudio previo sobre *H. parasuis* llevado a cabo en líneas celulares epiteliales de túbulos renales porcinos (PK-15) demostró que este microorganismo es capaz de interactuar con los TLRs, desencadenando la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Chen *et al.*, 2015a). Lo que se observó en dicho estudio fue que la interacción de la bacteria con TLR-4 o con heterodímeros TLR-2-TLR1 y TLR-2-TLR6 desencadenaba la activación de la vía de señalización de MyD88, tanto a través de NFκB como de MAPKs (p38 y JNK, pero no las ERKs), culminando con la activación de la expresión de IL-8 y CCL4. Otro hecho que comprobaron estos autores fue que la interacción con TLR-4, además de activar las rutas dependientes del MyD88, también estimulaba la vía de señalización mediada por el TRIF, concluyendo asimismo con la estimulación de la producción de IL8 y CCL4 mediada por NFκB. Posteriormente, un estudio publicado por los mismos investigadores (Chen *et al.*, 2015b) puso de manifiesto que *H. parasuis* inducía también la expresión de CCL5 (conocida también como RANTES), mediante la activación de los mismos TLRs, a través de la vía dependiente de MyD88, tanto por la ruta de NFκB como por la de las MAPKs, aunque en este caso solo la JNK. Además, como en el caso de la IL8 y CCL4, la expresión de CCL5 también podía ser desencadenada por la vía de señalización dependiente de TRIF, como consecuencia de la estimulación de TLR-4 por PAMPs de la bacteria. Estas tres citoquinas, IL-8, CCL4

y CCL5, presentan una función quimiotáctica, atrayendo células del sistema inmunitario al foco de infección.

Habría que plantearse, por otra parte, cuáles son las moléculas de *H. parasuis* capaces de estimular estos TLRs. Es conocido que el ligando característico responsable de la estimulación de TLR-4 es el LPS bacteriano y con respecto a *H. parasuis*, deberíamos pensar en el LOSs como el ligando capaz de interactuar con este receptor. Esta suposición se basa en que los LOSs presentes en esta bacteria no dejan de ser LPSs de corta longitud (Moran *et al.*, 1996), habiéndose descrito previamente la capacidad de estas variantes de LPSs para interactuar con TLR-4 humanos, tanto en otras bacterias del género *Haemophilus* (Li *et al.*, 2011) como del género *Nesisseria* (Liu *et al.*, 2010), con la consecuente activación de las rutas de señalización. Sin olvidar que ha sido descrita la capacidad de los LOSs de *H. parasuis* para estimular la producción de IL-8 en células del epitelio traqueal porcino (Bouchet *et al.*, 2009) y del endotelio microvascular cerebral (Bouchet *et al.*, 2008). Debe dejarse constancia de que en estos casos no se investigó la ruta seguida, aunque lo lógico sería pensar en aquellas iniciadas por el receptor TLR-4.

En el caso de la interacción de *H. parasuis* con TLR-2, podríamos sospechar de la participación de las porinas de su membrana externa, sin perjuicio de otros ligandos, como los LOSs. Estudios anteriores han demostrado la capacidad de las porinas de bacterias del mismo género, como *H. influenzae*, para estimular a TLR-2 en monocitos humanos o en macrófagos murinos (Galdiero *et al.*, 2004).

No obstante, la estimulación o no de un receptor, en este caso el TLR-2, no tiene por qué verse acompañada de un incremento de su expresión y, por lo tanto, no nos serviría para justificar los cambios de expresión en monocitos observada en este estudio como resultado de la sepsis inducida por *H. parasuis*. A día de hoy no se han estudiado los niveles de expresión de TLR-2 en precursores de monocitos porcinos, por lo que no sería posible establecer si estas modificaciones se deben a una sobreexpresión de los monocitos circulantes como resultado de su interacción con PAMPs y/o citoquinas o a una liberación de monocitos desde la médula con diferentes niveles de expresión o a una combinación de ambos.

Para intentar aclarar el asunto, pero sin mayor intención que la de hipotizar, podríamos fijarnos en lo observado con respecto a la regulación de este receptor en otras especies. Por ejemplo, en una investigación llevada a cabo sobre células epiteliales

humanas, incluido el epitelio respiratorio, se demostró que la interacción de *H. influenzae* con TLR-2 era capaz de inducir la expresión del propio receptor mediante la vía de NFκB mientras que la expresión de TLR-4 no se veía afectada por la misma bacteria (Shuto *et al.*, 2002). Con respecto a monocitos humanos, un estudio donde se exponían durante 24 horas a diferentes bacterias inactivadas por calor, demostró la capacidad de dos especies Gram negativas (*E. coli* y *N. meningitidis*) para estimular la expresión de TLR-2 en su superficie, al contrario de TLR-4 que no se modificaba sustancialmente o disminuían (Beran *et al.*, 2011). Esto concuerda con lo observado por nosotros, así que podríamos preguntarnos si la interacción entre la bacteria (o mejor dicho sus PAMPs) y el TLR2 de monocitos podría influir en la expresión del propio marcador. De todas formas no se puede descartar que la interacción de los monocitos con el ambiente inflamatorio durante la sepsis, como las citoquinas circulantes, pueda también influir en la expresión de dicho marcador. Por lo tanto, serán necesario nuevos estudios para aclarar si el incremento apreciado en monocitos para este receptor se debe a la interacción con ligandos de la bacteria, al ambiente de citoquinas presentes en la sangre, a una combinación de ambos factores o incluso a la liberación de monocitos desde la médula con diferente fenotipo.

En el caso de la expresión de TLR-4 conviene tener en cuenta la dinámica particular de este receptor con respecto a otros TLRs. Cuando el TLR-4 interactúa con su ligando, transmite una señal de transducción a través de MyD88, activando NfκB y MPAKs, lo que desencadena la producción de citoquinas pro-inflamatorias; acto seguido sufre endocitosis y desde esta localización intracelular transmite una nueva señal a través de la ruta de TRIF, activando NfκB e IFN tipo I (Chen *et al.*, 2015a). Teniendo en cuenta este hecho, y que, como hemos dicho anteriormente, se ha demostrado la capacidad de *H. parasuis* para estimular la ruta del TRIF mediante su interacción con TLR-4, lo cual implica su internalización, cabría preguntarse si esta endocitosis subsecuente a su activación podría ocultar una sobreexpresión inducida previamente por los PAMPs o por el ambiente. Esta posibilidad resulta interesante porque incluso podría explicar esa tendencia a disminuir los niveles de expresión tras el desafío que, aunque no resultó estadísticamente significativa, fue observada por nosotros en siete de los nueve animales estudiados. Planteada la cuestión, en futuros trabajos se podrían estudiar los niveles intracelulares de este receptor.

Con respecto a CD163, se observó que tras 24 horas del inicio de la infección, los monocitos circulantes presentaban unos niveles de expresión considerablemente más

elevados que los mostrados antes de la infección. Algo similar ya fue observado en un estudio anterior en el que monocitos procedentes de cerdos infectados experimentalmente con *Actinobacillus pleuropneumoniae* presentaban unos niveles significativamente más elevados para este marcador que los monocitos procedentes de cerdos sanos (Ondrackova *et al.*, 2013).

Varios estudios indican que los monocitos porcinos CD163⁺ presentan un fenotipo atribuible a un mayor grado de maduración que los CD163⁻. Por ejemplo Chamorro *et al.* (2000) observaron que los monocitos CD163⁺ expresaban más intensamente marcadores relacionados con la migración a órganos (integrinas) y con la presentación antigénica (SLA II) y plantearon unas fases de maduración que comenzarían con un fenotipo para monocitos inmaduros de CD14^{hi}/CD163⁻/SWC9⁻, que posteriormente madurarían a un fenotipo de CD14^{lo}/CD163⁺/SWC9⁻ que, tras la migración a órganos, se convertirían en macrófagos CD14^{lo}/CD163⁺/SWC9⁺ (no obstante, hay que indicar que no todos los macrófagos porcinos son CD163⁺). Posteriormente, los mismos autores (Chamorro *et al.*, 2005) confirmaron la tendencia del incremento de expresión de CD163 a lo largo de la maduración de los monocitos y propusieron la siguiente ruta de maduración: primera fase, SWC3⁺/CD163⁻/CD14⁺/SLA DR⁻; segunda fase, SWC3⁺/CD163⁻/CD14⁺/SLA DR⁺; tercera fase, SWC3⁺/CD163⁺/CD14⁺/SLA DR⁺ y cuarta fase, SWC3⁺/CD163⁺/CD14⁻/SLA DR⁺. Otro trabajo (Poderoso *et al.*, 2011) puso de manifiesto que en los ganglios linfáticos porcinos, los macrófagos CD163⁺ se encuentran en los senos subcapsulares, lugar predispuesto a la recepción de antígenos llegados a través de los vasos aferentes, mientras que los macrófagos CD163⁻ se localizan en la zona folicular. Como se verá más adelante, los macrófagos de los senos subcapsulares son prácticamente todos positivos para los receptores CD163 y para Siglec-1. En el mismo estudio se observó que, dirigiendo antígenos al receptor CD163, se incrementaba la respuesta inmunitaria humoral en el animal hacia el antígeno dirigido y la proliferación *in vitro* de PBMCs. Esto viene a reforzar la idea de que los monocitos/macrófagos CD163⁺ poseen una mayor capacidad de presentación de antígenos.

Como de estos estudios se desprende, conforme se va produciendo la maduración de los monocitos porcinos o de sus precursores, se tiende a incrementar los niveles de CD163, por lo tanto, como lo normal sería que los monocitos liberados desde la médula presentasen un grado inferior de maduración que los circulantes, resultaría

tentador descartar dicha liberación de monocitos como explicación a los incrementos de niveles de CD163, y achacarla a la interacción entre los monocitos y el ambiente reinante en el torrente sanguíneo durante la sepsis. Sin embargo, en estudios recientes se han encontrado en la médula subpoblaciones de precursores de monocitos porcinos que son CD163⁺ cuyo fenotipo parece indicar un mayor estado de maduración que el de los precursores CD163⁻ (Ondrackova *et al.*, 2010). Y además, también se ha observado que la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a la par de inducir una mayor expresión de CD163 en monocitos circulantes como dijimos antes, también es capaz de inducir el incremento de expresión de este receptor en sus precursores medulares (Ondrackova *et al.*, 2013). Por lo tanto, no se puede descartar la influencia de la liberación de monocitos por la médula en los cambios observados para CD163 en nuestro caso, pareciendo más sensato inclinarse por una combinación entre la liberación de nuevos monocitos desde la médula (previamente estimulados por el ambiente para incrementar los niveles del marcador) y la interacción entre monocitos circulantes y el ambiente inflamatorio.

Aún con todo, tanto si el incremento de CD163 se produce a nivel de monocitos circulantes, como a nivel de precursores, como de ambos, está claro que el desencadenante es el ambiente inflamatorio por lo que habría que preguntarse cuál sería el mecanismo que estimula su expresión.

En los monocitos humanos se ha descrito cómo el estímulo de diferentes TLRs con sus ligando, entre los que se encuentran TLR-2 y TLR-4, desencadena la producción de IL-6 e IL-10 que, al actuar sobre el propio monocito, o sobre los monocitos cercanos, estimulan la expresión de CD163 (Weaver *et al.*, 2007). En el caso de los monocitos porcinos también se observó que la expresión de CD163 estaba regulada positivamente por la IL-10 (Ezquerria *et al.*, 2008). Con esta información previa, para explicar el gran incremento de los niveles de expresión de esta molécula observado por nosotros sobre monocitos como consecuencia de la infección, podríamos apelar, tanto a la activación de los TLRs de los propios monocitos, como a la presencia en el ambiente de IL-10 u otras citoquinas en sangre, o también a una combinación de ambos mecanismos. Teniendo en cuenta que, tras la infección apreciamos una tendencia en los monocitos a que, a mayor expresión de TLR-2, se producía una mayor expresión de CD163, resulta interesante plantearse si, la estimulación del TLR-2 por parte de *H. parasuis* en los monocitos, podría desencadenar la expresión en su superficie de más TLR-2 y CD163.

No debe extrañar que la citoquina encargada de estimular la producción de CD163 en los monocitos porcinos sea la IL-10, que es conocida por su efecto anti-inflamatorio, teniendo en cuenta las funciones anti-inflamatorias atribuidas a este marcador. Por ejemplo, su contribución a la eliminación de DAMPs, como por ejemplo la HMGB1 circulante, que se sabe que es capaz de estimular los TLRs porcinos (Duan *et al.*, 2014), o como también la hemoglobina libre. Con respecto a esta última, aunque nunca se ha demostrado *in vitro* la capacidad de *H. parasuis* de hemolizar la sangre, estudios recientes han identificado varios genes que codifican hemolisinas presentes solo en algunas cepas virulentas (Lawrence & Bey, 2015), por lo que se podría especular con su activación en el hospedador. Además, en *H. influenzae* se han descrito varias proteínas capaces de unirse a la hemoglobina libre y al complejo hemoglobina-haptoglobina, con el propósito de abastecerse de grupos hemo, como fuente de hierro para la bacteria (Cope *et al.*, 2000); por lo tanto, la eliminación de estos complejos de la circulación por parte del CD163 tendría un nuevo efecto positivo para el hospedador, ya que contribuiría a restar disponibilidad de grupos hemo para las bacterias.

Los niveles en sangre de la haptoglobina, la cual es imprescindible junto a CD163 para la eliminación de HMGB1 y hemoglobina circulantes, también se ven aumentados durante la infección sistémica por *H. parasuis*, como se ha demostrado previamente en un trabajo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación (Martin de la Fuente *et al.*, 2010).

Por otro lado, no debe olvidarse que CD163 también posee una función pro-inflamatoria, responsable de detectar bacterias y desencadenar la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL1 β , la IL6 y el TNF α . Un estudio llevado a cabo con *H. parasuis* (Costa-Hurtado *et al.*, 2013) indicó que, después de 20 horas de cultivo de macrófagos alveolares porcinos en presencia de cepas virulentas y avirulentas, se producía un descenso de los niveles de expresión de CD163. Este descubrimiento podría, en principio, contradecir lo observado por nosotros en monocitos; sin embargo, en el mismo estudio, aunque no analizaron los monocitos, sí que observaron que como consecuencia de una infección experimental con las cepas virulentas, aunque en las primeras 24 horas posteriores se producía un descenso de los niveles, a partir de 48 horas la tendencia se invertía, incrementándose con respecto a los niveles iniciales. Considerando estos resultados y los nuestros, se podría pensar que, aunque inicialmente los macrófagos alveolares tiendan a disminuir la expresión de los CD163 en presencia de

H. parasuis, el reclutamiento posterior de monocitos sanguíneos con mayores niveles de CD163 para asentarse en los pulmones como macrófagos alveolares, desencadena un incremento de la IMF del marcador en la población total.

En nuestro estudio, la enfermedad cursó de una forma más aguda que en la investigación citada antes y, aunque no se pueda descartar diferencias relacionadas con las líneas raciales utilizadas, lo más probable es que el carácter más agudo en nuestro caso haya sido debido por un lado al empleo de la vía intratraqueal por nuestra parte frente a la intranasal utilizada por ellos, y por otro lado, a la mayor dosis de infección utilizada por nosotros (del orden de 10^8 UFCs), frente a la de ellos (del orden de 10^6 para la cepa Nagasaki, y del orden de 10^7 para la cepa IT25209) (Costa-Hurtado *et al.*, 2013). Debido a esto, en nuestro caso no nos fue posible alargar el estudio más allá de las primeras 24 horas posteriores a la infección.

Conviene mencionar que en una investigación posterior llevada a cabo por el mismo grupo anterior (Bello-Ortí *et al.*, 2015) se comprobó que, tan solo dos horas después de la inoculación de la cepa Nagasaki, se producía un incremento de este marcador en la superficie de los macrófagos alveolares. Sin embargo, en este caso solo se utilizó un animal control y otro infectado, comparando los niveles de expresión de los CD163 en los macrófagos alveolares de un cerdo con los del otro, por lo que no es posible establecer significación estadística, más allá del propio dato. Como el incremento se podría deber simplemente a diferencias individuales entre los dos cerdos utilizados, preferimos no tener en cuenta este último estudio, a pesar de que parece indicar, como en nuestro caso, que la infección de *H. parasuis* estimula la expresión de CD163⁺.

Como se comentó anteriormente con respecto a Siglec-1, tanto los dobles marcajes con anti-CD163 como con anti-CD172a mostraron que todos los animales, en ambos momentos, presentaban una subpoblación de monocitos positivos para dicho marcador, lo cual, como ya se comentó, puede ser explicado por la procedencia de las muestras de animales jóvenes. En esta subpoblación no observamos diferencias de expresión de este receptor entre ambos momentos, ni en cuanto a IMF ni en cuanto al porcentaje de células positivas sobre monocitos totales. En cambio, si detectamos que una pequeña subpoblación de monocitos que presentaba un fenotipo CD163⁻/Siglec-1⁺ desaparecía tras el desafío. Este hecho podría explicarse simplemente como una regulación positiva de la expresión de CD163, que conllevaría que todas las células de la subpoblación CD163⁻/Siglec-1⁺ se volvieran CD163⁺. Por otro lado, resulta interesante

el estudio de Poderoso *et al.* (2011), quienes pusieron de manifiesto que los macrófagos presentes en los vasos elipsoidales de la zona marginal del bazo porcino, donde se controla la llegada de antígenos por vía sanguínea, son mayoritariamente CD163⁻/Siglec-1⁺. Teniendo en cuenta este dato, podríamos especular con la idea de que la subpoblación de monocitos CD163⁻/Siglec-1⁺ fuese reclutada hacia la zona marginal del bazo para asentarse como macrófagos y captar antígenos de la sangre para su posterior presentación a linfocitos T. Aunque, como hemos indicado antes, los monocitos/macrófagos CD163⁺ presentan un fenotipo más relacionado con la capacidad de presentar antígenos que los CD163⁻, en el caso de los macrófagos esplénicos se observó que esta tendencia se invertía, puesto que la subpoblación CD163⁻/Siglec-1⁺ presentaba niveles de SLA II y CD80/86 más elevados que la subpoblación de CD163⁺/Siglec-1⁻, la otra gran subpoblación del bazo, localizada en pulpa roja (Álvarez *et al.*, 2014). Además también se ha demostrado, igual que sucede con CD163, que dirigir antígenos hacia Siglec-1 incrementa la respuesta inmune humoral hacia el antígeno dirigido y la proliferación *in vitro* de PBMCs (Poderoso *et al.*, 2011; Revilla *et al.*, 2009).

Por otro lado, la población de monocitos Siglec-1⁺/CD163⁺ podría ser la que se dirigiera a los órganos en los que se ha observado que sus macrófagos presentan mayoritariamente este fenotipo, por ejemplo el pulmón (Yuste *et al.*, 2017) o el seno subcapsular de los ganglios linfáticos (Poderoso *et al.*, 2011), lugar a donde llegan los antígenos por vía linfática. Como se piensa que este receptor interviene en el reconocimiento de los patógenos sializados y *H. parasuis* presenta sialización de sus LOSs, es de suponer que desempeñe un papel importante en el reconocimiento de dicha bacteria, tanto en el pulmón, donde se encontrarían los macrófagos alveolares Siglec-1⁺/CD163⁺, como en el sistema linfático, donde se alojarían los macrófagos Siglec-1⁺/CD163⁺ de los senos subcapsulares, como en su diseminación sanguínea, donde podría ser detectado por los macrófagos Siglec-1⁺/CD163⁻ de la zona marginal del bazo, además de monocitos Siglec-1⁺ presentes en torrente sanguíneo. En el mismo trabajo en el que se estudió la modificación de la expresión de CD163 en macrófagos alveolares durante la infección con *H. parasuis* (Costa-Hurtado *et al.*, 2013), se observó que, por un lado, los macrófagos cultivados *in vitro* en presencia de cepas virulentas no sufrían modificaciones en la expresión de Siglec-1 y, por otro, que a las 48 horas de la infección en el animal se producía un incremento significativo de los niveles de este receptor en los macrófagos alveolares, para luego descender por debajo de los niveles iniciales.

Con respecto a los Siglec tipo CD33 estudiados en el presente trabajo (Siglec-3, Siglec-5 y Siglec-10), solo se pudo establecer una tendencia tras la infección con el Siglec-3, ya que el receptor Siglec-10 no se vio modificado y en el Siglec-5 las observaciones parecían aleatorias. Como en el caso de TLR-2, se apreció un incremento significativo de Siglec-3 tras la infección, así como una relación entre las expresiones de este receptor y la de CD163.

Para Siglec-3 se han descrito previamente niveles de expresión menores en los precursores medulares que en los monocitos porcinos (Álvarez *et al.*, 2015). Por lo tanto, su incremento tras la infección no podría ser explicado como liberación de los monocitos jóvenes con diferente fenotipo.

Un estudio realizado con macrófagos procedentes de ratón (Boyd *et al.*, 2009) demostró que, estimulando estas células con agonistas de diferentes TLRs, se producía un incremento de la expresión del Siglec-E, un Siglec tipo CD33 murino, a través de la vía de señalización de MyD88. Como estos tipos de Siglecs ejercen un efecto inhibitorio sobre la señal de los TLRs, se supuso que esta regulación positiva del Siglec-E tras la estimulación de los TLRs constituiría un mecanismo de autocontrol para contrarrestar un exceso de activación de los TLRs durante la inflamación. En el caso de nuestros experimentos, como observamos que una mayor expresión de CD163 suponía una mayor expresión de TLR-2 y Siglec-3, podríamos deducir que la misma relación tendría lugar entre TLR-2 y Siglec-3. Podría postularse entonces que la expresión de Siglec-3 sería la consecuencia de la estimulación de los TLRs y su fin último consistiría en la regulación negativa de la señal de dichos receptores. Esta idea resultaría atractiva de no ser porque en los estudios *in vitro* llevados a cabo sobre monocitos porcinos (Álvarez *et al.*, 2015), no se consiguió inducir la expresión de este marcador ni con el empleo de ligandos de TLRs ni con citoquinas como la IL-4, IL-10, TNF α o INF γ . Por lo tanto, no podemos esclarecer cuál es la razón del incremento de la expresión del Siglec-3 observada durante la infección.

Resumiendo pues, hemos estudiado sobre PBMCs porcinos las modificaciones inducidas durante un proceso séptico, en diferentes receptores relacionados con la respuesta inmunitaria y la sepsis. Los resultados han demostrado que durante el proceso séptico se produce en los monocitos porcinos un incremento de la expresión de los CD163, TLR-2 y de Siglec-3, además de apreciarse una relación de mayor expresión de TLR-2 y Siglec-3 cuanto mayor sea la expresión de CD163. Asimismo, se observó que el

establecimiento del proceso séptico producía la desaparición de una subpoblación de monocitos CD163⁻/Siglec-1⁺. En cambio, sobre los receptores TLR-4 y Siglec-10 no se observaron diferencias significativas entre antes y después de la infección, mientras que en el caso de los Siglec-5 los resultados no fueron concluyentes. Como se propuso anteriormente, al tratarse de un proceso muy agudo, no se pudieron valorar los cambios producidos después de las primeras 24 horas. Resultaría interesante en estudios futuros utilizar dosis menores de inóculo para poder alargar el curso del proceso séptico, y así poder observar los cambios desarrollados durante más instantes. Además, estos estudios podrían despejar dudas sobre si los cambios se producen por liberación de monocitos con diferente fenotipo, por influencia del ambiente circulatorio, por la interacción de los monocitos con la bacteria o por una combinación de estos mecanismos. Por otro lado, el empleo de otros microorganismos permitiría saber si estas modificaciones son específicas de las bacterias recubiertas por ácido siálico, de todas los microorganismos Gram negativos o incluso solo de *H. parasuis*.

En cualquier caso, los cerdos privados de calostro e infectados con *H. parasuis* parecen tratarse de un buen modelo en el que profundizar en el estudio de los procesos sépticos e incluso obtener información extrapolable en parte a los humanos.

5.3. BÚSQUEDA MEDIANTE ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS DE PROTEÍNAS SOBREENPRESADAS EN LA SUPERFICIE DE *Haemophilus parasuis* EN CONDICIONES DE CULTIVO MIMÉTICAS A LAS DE LA INFECCIÓN

5.3.1. Condiciones de cultivo empleadas

Al encontrarse dentro del hospedador, la mayoría de las bacterias remodelan sus estructuras de recubrimiento, ya que necesitan adaptarse a un nuevo ambiente potencialmente dañino para ellas (Darwin, 2013). Considerando este hecho, el principal objetivo del presente apartado de esta Tesis Doctoral consistió en la búsqueda de proteínas que presentaran una mayor probabilidad de sobreexpresarse sobre la superficie de *H. parasuis* durante la infección y, por lo tanto, constituyeran una buena opción para su futuro uso como antígenos vacunales.

La estrategia seleccionada fue la de utilizar la técnica *RNA sequencing* para realizar un estudio diferencial del transcriptoma de *H. parasuis* crecido en dos cultivos diferentes. El primero, referido aquí como “condiciones normales”, consistió en cultivar la bacteria en sus condiciones estándares de cultivo *in vitro*, es decir caldo PPLO (enriquecido con NAD y glucosa) a 37 °C; mientras que el segundo, en el que se empleó el mismo medio de cultivo, se utilizó una temperatura de 41°C y dipirilo como agente secuestrante del hierro.

Aunque el ambiente que soporta la bacteria en el interior del hospedador es sin duda mucho más complejo que el que se pueda reproducir en el laboratorio, con estas dos condiciones, alta temperatura y secuestro del hierro disponible, se intentó simular en parte ese ambiente, por lo que estas condiciones de cultivo fueron denominadas como “condiciones miméticas de la infección natural” y se asumió que aquellos genes sobreexpresados en ellas con respecto a las condiciones normales tendrían una gran probabilidad de encontrarse también sobreexpresados durante la infección natural en el hospedador.

El hierro es un componente esencial para la mayoría de los organismos debido al papel que representa en las reacciones redox. Como en el interior del hospedador las concentraciones de hierro libre disponible son muy limitadas, las bacterias patógenas han

desarrollado diferentes estrategias para satisfacer sus necesidades de hierro durante los procesos infecciosos. Un ejemplo son los sideróforos y hemóforos, que son moléculas secretadas al exterior, para unirse a moléculas de hierro o grupos hemo respectivamente, tanto si éstos se encuentran en forma libre como incluidos en proteínas. En ambos casos se forman complejos que son captados por receptores específicos de la superficie bacteriana. Otro ejemplo son los receptores de membrana para el grupo hemo, capaces de obtenerlo a partir de las proteínas que contienen dicho grupo. Un tercer ejemplo son proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas, capaces de reconocer y unirse a proteínas (complejos proteicos) que contienen hierro, como la transferrina, reconocida por las “proteínas de unión a la transferrina” (Tbp A y B), o la lactoferrina, reconocida por las “proteínas de unión a la lactoferrina” (Lbp A y B). Todos estos mecanismos comparten la necesidad de utilizar receptores expuestos en la superficie bacteriana (Parrow *et al.*, 2013). Las escasas concentraciones de hierro en el hospedador provocan una inducción de la expresión de estos receptores en las bacterias, traduciéndose en una mayor abundancia en su superficie (Goethe *et al.*, 2000).

Con respecto a la temperatura elevada conviene decir que, igual que la temperatura homeostática del hospedador puede servir como señal de aviso para las bacterias patógenas de que se encuentran en el hospedador y deben activar los genes necesarios para la invasión, se especula con que, asimismo, las temperaturas propias de los procesos febriles o inflamatorios podrían servir como señal para el patógeno de que el hospedador se encuentra defendiéndose y por lo tanto es necesario pasar a una fase de “persistencia” mediante los cambios transcriptómicos correspondientes (Gonzalez Plaza *et al.*, 2016), los cuales pueden corresponderse con cambios en la superficie bacteriana. Por otro lado, dependiendo de la especie bacteriana, una temperatura de 41°C también puede producir un efecto de estrés térmico que afecte al crecimiento bacteriano, como parece ser sucede en el caso de *H. parasuis*, a tenor de los resultados de las curvas de crecimiento. Dicho estrés conlleva una modificación del transcriptoma mediante la expresión de, entre otros genes, aquellos codificantes de un tipo de chaperonas conocidas como proteínas de estrés celular o de choque térmico que, con independencia de su nombre, también son inducidas por otros tipos de estrés sufridos por la bacteria durante la infección (Henderson *et al.*, 2006). Estas proteínas, además de actuar como chaperonas en el interior de la bacteria, presentan diversas funciones paralelas, habiéndose descrito su presencia en la membrana o en el exterior celular desempeñando papeles relacionados

con la patogenia (Ghazaei, 2017). Por tanto, los genes inducidos por el efecto de la temperatura en la bacteria pueden ser comunes a los inducidos por otros factores estresantes.

Previamente se han realizado estudios sobre las modificaciones en el transcriptoma de *H. parasuis* cuando la bacteria era sometida a estas dos condiciones miméticas de alta temperatura y escasez de hierro (Hill *et al.*, 2003; Melnikow *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2009). Sin embargo, las dos condiciones en estos estudios no eran estudiadas en conjunto, debido a que los objetivos estaban más bien encaminados a profundizar en el conocimiento del metabolismo y de los factores de virulencia, pero no a la búsqueda de candidatos que pudieran ser utilizados como antígenos vacunales. Además, las investigaciones fueron realizadas hace varios años y, aunque no existe duda de que en su momento contribuyeron enormemente al conocimiento de la bacteria, las técnicas empleadas en ellas, como la *differential display real time PCR* (Hill *et al.*, 2003), el análisis mediante micromatrices (*microarrays*) (Melnikow *et al.*, 2005) o el SCOTS (captura selectiva de secuencias transcritas) (Xie *et al.*, 2009) son métodos menos robustos que el *RNA sequencing* (Zhao *et al.*, 2014), técnica seleccionada para el presente trabajo. En otro estudio llevado a cabo mediante SCOTS (Jin *et al.*, 2008) se investigaron las modificaciones sobre el transcriptoma de bacterias procedentes de pulmones necróticos, lo que constituyó la primera aproximación *in vivo* del perfil de expresión de *H. parasuis*, a la que hay que añadir otra investigación realizada recientemente, en la que se estudiaron mediante *RNA sequencing* las diferencias entre las bacterias cultivadas en placa y las bacterias expuestas durante dos horas al interior del pulmón porcino (Bello-Ortí *et al.*, 2015).

5.3.2. Sobreexpresión en condiciones miméticas

5.3.2.1. Proteínas expuestas en la superficie bacteriana

Como podíamos suponer, los genes que codifican para las proteínas de unión a la transferrina porcina, TbpA (*HAPS_RS10805*) y TbpB (*HAPS_RS10800*), aparecieron entre las proteínas más sobreexpresadas en las condiciones miméticas a las que nos hemos referido. Como hemos indicado en otro capítulo, estas dos proteínas ya han sido caracterizadas inmunológicamente por nuestro grupo (Frاندoloso *et al.*, 2011b), por lo que no comentaremos nada más acerca de ellas.

Otro sistema de captación de hierro que resultó sobreexpresado en estas condiciones fue el operón de “utilización del grupo hemo y hemopexina” (*hxu* por sus siglas en inglés). Este operón está constituido por tres genes, conocidos como *hxuA* (*HAPS_RS10595*), *hxuB* (*HAPS_RS10590*) y *hxuC* (*HAPS_RS10585*). El primero de estos genes codifica un hemóforo conocido como proteína de unión a grupo hemo/hemopexina, cuya finalidad consiste en ser secretado al exterior y sustraer el grupo hemo a la hemopexina del hospedador. El encargado de secretarlo es un transportador localizado en la membrana externa, codificado por el gen *hxuB*. Una vez que el hemóforo ha captado un grupo hemo, es reconocido por un receptor de membrana de la bacteria codificado por el gen *hxuC*. Este sistema se ha descrito previamente como factor de virulencia en *H. influenzae* (Morton *et al.*, 2007). La sobreexpresión de los tres genes de este operón ya habían sido observada en condiciones restrictivas de hierro en el estudio previo con *microarrays* llevado a cabo por Melnikow *et al.* (2005). En nuestro caso, los tres genes se encontraron muy sobreexpresados en condiciones miméticas, siendo *hxuA* y *hxuC* el primer y segundo gen más sobreexpresado respectivamente. Recientemente, estas tres proteínas fueron caracterizadas inmunológicamente en *H. parasuis* y se evaluó su capacidad protectora en ratones frente a un desafío con la bacteria. Las tres aportaron cierto grado de protección, siendo la HxuC la que más, con un 87,5% de supervivencia, seguida de la HxuB con un 62,5%, mientras que la HxuA fue la que menos protección aportó, con un 37,5%, debido seguramente a su secreción al exterior (Wen *et al.*, 2016). En otro estudio aún más reciente, se valoró en el ratón la protección otorgada por varias proteínas por separado, entre las que se encontraba HxuC; en este caso, la proteína mostró una capacidad protectora menos eficaz, inferior al 50% (Li *et al.*, 2017).

Continuando con los sistemas de captación de hierro sobreexpresados, también lo resultó el gen *fhuA* (*HAPS_RS00485*), que codifica una OMP que actúa como receptor de complejos formados entre hierro y sideróforos de tipo hidroxamato. Este receptor se integra en un sistema en el que también intervienen las proteínas codificadas por los genes *fhuB*, *fhuC* y *fhuD*, las cuales están localizadas en el periplasma (*FhuD*) o en la membrana interna (*FhuB* y *FhuC*) e intervienen en el transporte de los complejos hierro-sideróforos entre el periplasma y el citoplasma (Mikael *et al.*, 2002). De estos cuatro genes, tan solo el que codifica *FhuA* apareció sobreexpresado, si bien es cierto que también apareció sobreexpresado un transcrito (*HAPS_RS00480*) que por homología podría corresponderse con *FhuC*, aunque en la base de datos figura anotado como un pseudogen. Un trabajo realizado previamente por nuestro grupo de investigación (del Río *et al.*, 2006) caracterizó los genes *fhu* en *H. parasuis* y, además, en el caso del receptor *FhuA*, observó mediante *immunoblotting* que dicha proteína era reconocida por el suero de cerdos expuestos a la bacteria. Sin embargo, también describieron que el sometimiento de la bacteria a condiciones restrictivas de hierro no parecía influir en los niveles de expresión del receptor.

En el estudio de Melnikow *et al.* (2005) tampoco encontraron *fhuA* entre los genes sobreexpresados en condiciones restrictivas del hierro. *A priori*, la explicación para la contradicción entre lo observado en estos dos trabajos anteriores y los resultados obtenidos en el presente estudio podría radicar en la mayor sensibilidad de nuestra técnica; sin embargo, esto tendría más sentido en caso de tratarse de un gen ligeramente sobreexpresado y no de uno claramente sobreexpresado como fue el caso. Por lo tanto, nos parece más correcto achacar la diferencia de expresión a que en nuestro caso las condiciones de cultivo no eran exactamente las mismas puesto que además de la restricción de hierro también empleamos una temperatura elevada. En el estudio de Melnikow *et al.* (2005) tampoco observaron que el incremento de temperatura fuera suficiente para sobreexpresar dicho gen, así que quizás sea necesaria una combinación de ambas condiciones, escasez de hierro y alta temperatura (u otro factor estresante), para inducir la sobreexpresión del gen.

El receptor *FhuA*, además de ser capaz de inducir anticuerpos frente a él, también posee importancia como diana terapéutica, puesto que su proteína homóloga en *E. coli* actúa como diana para diferentes bacteriófagos, para la colicina M o incluso para antibióticos, como la albamicina y la rifamicina (Mikael *et al.*, 2002).

La energía necesaria para el funcionamiento de estos tres mecanismos de captación de hierro es aportada por el sistema TonB/ExbB/ExbD (del Río *et al.*, 2005; Goethe *et al.*, 2000), cuyos genes se encontraron también sobreexpresados (*HAPS_RS06610*, *HAPS_RS10790* y *HAPS_RS10795*).

Otra OMP cuyo gen se halló entre los transcritos sobreexpresados (*HAPS_RS03735*) fue una proteína acomodadora de fimbria (*fimbrial usher protein*), con homología con FimD/PapC. Dichas proteínas intervienen en el transporte a través de la membrana externa de las subunidades de las fimbrias, en su ensamblaje y en el anclaje a la membrana externa (Geibel & Waksman, 2014).

El gen que codifica la OMP TolC (*HAPS_RS10530*) también se encontró entre los sobreexpresados. Esta proteína forma un canal trimérico en la membrana externa que interviene en el transporte de diversas moléculas (Koronakis *et al.*, 2000). En un estudio publicado recientemente (Li *et al.*, 2017) los autores observaron que los ratones inmunizados con esta proteína y posteriormente desafiados con la bacteria mostraban una supervivencia del 80%.

El gen *HAPS_RS04485*, que resultó sobreexpresado en estas condiciones, codifica una proteína de 196 aminoácidos que no aparece caracterizada ni en “Genbank” ni en “Uniprot”. Mediante BLASTp tampoco se le encontró homología con ninguna proteína caracterizada en estas bases de datos. Tan solo pudimos encontrar, tras su estudio en “InterProScan”, que presenta dos dominios consecutivos de plegamiento tipo inmunoglobulina (*Immunoglobulin-like fold*). En procariontes, estos dominios suelen estar presentes en proteínas relacionadas con la invasión o la adhesión (Bodelon *et al.*, 2013).

Dos transcritos sobreexpresados, *HAPS_RS00745* y *HAPS_RS00740*, codificaban respectivamente una proteína hipotética y un autotransportador. Al estudiar mediante BLASTp en otras cepas de *H. parasuis* nos encontramos con que realmente se trataban de los extremos N-terminal y C-terminal de una proteína de gran tamaño. En el genoma de la cepa utilizada como referencia (SH0165) su gen viene anotado como dos genes diferentes, debido a que presenta una señal de parada que trunca la proteína; sin embargo, en otras cepas de la misma especie no aparece dicha señal de parada (por ejemplo, en el caso de la proteína WP_021112176.1). Al estudiar los dominios de las secuencias de otras cepas en “InterProScan”, pudimos comprobar que el extremo C-terminal presentaba un barril β de autotransportador mientras que en el extremo N-

terminal aparecía un dominio de peptidasa serin-proteasa. Por otro lado, esta proteína presentaba homología con el autotransportador AasP del también patógeno respiratorio porcino *A. pleuropneumoniae*, proteína que posee la misma distribución de dominios y que también se sobreexpresa en condiciones de carencia de hierro. La función de AasP en *A. pleuropneumoniae* parece estar relacionada con la adhesión en condiciones restrictivas del hierro, puesto que un mutante con delección para su gen correspondiente mostraba una menor adhesión solamente cuando escaseaba el oligoelemento (Tegetmeyer *et al.*, 2009). Esta proteína fue estudiada como antígeno vacunal en el cerdo frente a *A. pleuropneumoniae* y se dedujo que no inducía una protección relevante (Oldfield *et al.*, 2009).

El gen *HAPS_RS10780* resultó igualmente sobreexpresado. Se corresponde con una OMP que, según la base de datos de la plataforma “InterProScan”, presentaba un dominio barril β en su extremo C-terminal y una repetición de un motivo de repetición de tetrápico péptido (TPR). Este motivo suele estar relacionado con la interacción proteína-proteína y con el ensamblaje de los complejos proteicos (D'Andrea & Regan, 2003). La proteína muestra homología con proteínas de diferentes especies bacterianas de la familia *Pasteurellaceae* poseedoras también del barril β y del motivo TPR. Sin embargo, ninguna de ellas presenta una función conocida.

Por último, entre aquellos genes sobreexpresados que codifican proteínas expuestas a la superficie celular nos encontramos con dos, *HAPS_RS00735* y *HAPS_RS01895*, que codifican dos pequeñas proteínas con una supuesta localización en la membrana externa y extracelular, respectivamente. No se pudieron detectar ni dominios ni homologías con proteínas de función conocida.

En todas estas proteínas, se detectó además una relación con la patogenicidad mediante su estudio con la aplicación MP3.

Resumiendo, mediante este trabajo de expresión diferencial hemos localizado 13 proteínas ubicadas en la superficie de la cepa Nagasaki de *H. parasuis* (utilizando como genoma de referencia una cepa del mismo serotipo, SH0165) que, al mostrarse sobreexpresadas en las condiciones de estudio, las cuales pretendían reproducir el ambiente del hospedador, pensamos que podrían poseer una elevada probabilidad de presentarse en mayor cantidad en la superficie de la bacteria cuando ésta se encuentra produciendo la infección y, por lo tanto, podrían constituir una buena diana, *a priori*, para

el sistema inmunitario adquirido. Además, en todas ellas se predijo bioinformáticamente su relación con la patogenia. Dos de estas proteínas, TbpA y TbpB, ya han sido probadas como antígenos vacunales en cerdos, ofreciendo una protección parcial (Frndoloso *et al.*, 2011b), o incluso con una protección total en el caso de la TbpB cuando sufría una mutación en un único aminoácido (Frndoloso *et al.*, 2015b). Otras cuatro proteínas, HxuA, HxuB, HxuC y TolC, han sido probadas muy recientemente como antígenos vacunales en modelos murinos, con diferentes grados de protección parcial frente al desafío con la bacteria (Wen *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Las otras siete proteínas no han sido estudiadas como antígenos vacunales, por lo que en investigaciones futuras se podría valorar su eficacia en este sentido. De hecho, para una de ellas, el receptor de sideróforo FhuA, se han detectado anticuerpos en el suero de cerdos infectados con *H. parasuis*.

En la Tabla 33 mostramos las trece proteínas sobreexpresadas, indicando el *locus* en el genoma de referencia utilizado, su nombre o, en su defecto, el nombre de las proteínas homólogas en otras especies o los motivos encontrados en su secuencia y si han sido estudiadas como antígenos vacunales, indicando la especie modelo empleada.

<i>Locus</i>	Nombre o hallazgos en proteína	¿Uso previo como Ag vacunal?
<i>HAPS_RS10805</i>	TbpA	Sí (Cerdo)
<i>HAPS_RS10800</i>	TbpB	Sí (Cerdo)
<i>HAPS_RS10595</i>	HxuA	Sí (Ratón)
<i>HAPS_RS10590</i>	HxuB	Sí (Ratón)
<i>HAPS_RS10585</i>	HxuC	Sí (Ratón)
<i>HAPS_RS10530</i>	TolC	Sí (Ratón)
<i>HAPS_RS00485</i>	FhuA	No
<i>HAPS_RS03735</i>	Proteína acomodadora de fimbria con homología con FimA y PapD	No
<i>HAPS_RS04485</i>	Dominio de plegado tipo inmunoglobulina	No
<i>HAPS_RS00740</i> + <i>HAPS_RS00745</i>	Homología con AasP de <i>A. pleuropneumoniae</i>	No
<i>HAPS_RS10780</i>	OMP con barril β y TPR	No
<i>HAPS_RS00735</i>	Sin homología con proteínas de función conocida	No
<i>HAPS_RS01895</i>	Sin homología con proteínas de función conocida	No

Tabla 33: Resumen de proteínas sobreexpresadas en condiciones miméticas y su empleo como antígenos vacunales.

5.3.2.2. Proteínas de choque térmico

Como se dijo anteriormente, la bacteria tiene que enfrentarse a una serie de factores estresantes durante la infección, como pueden ser las temperaturas desfavorables, los cambios de pH o la presencia de radicales libres, lo cual desencadenan la expresión de una serie de proteínas conocidas como proteínas de estrés celular (Ghazaei, 2017). Dichas proteínas, que a menudo son denominadas proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en inglés) porque inicialmente se describieron como inducibles por estrés térmico, se comportan como chaperonas favoreciendo el ensamblado de otras macromoléculas y se encuentran presentes en todos los seres vivos (Henderson *et al.*, 2006). Entre los genes sobreexpresados en condiciones miméticas nos encontramos con varios codificantes de diferentes Hsp, como la DnaJ (*HAPS_RS09165*), DnaK (*HAPS_RS02685*), HslO (*HAPS_RS04050*) y HslR (*HAPS_RS04045*). La proteína de choque térmico DnaK pertenece a la familia Hsp70 y se encarga de facilitar el plegamiento correcto de proteínas a nivel citoplasmático, evitando su agregación que resultaría como resultado de las condiciones estresantes, tarea en la que es ayudada por la DnaJ, otra chaperona de la familia Hsp40 (Henderson *et al.*, 2006). La HslO, por su parte, posee una función protectora, tanto frente al estrés térmico como frente al oxidativo (Ruddock & Klappa, 1999). La HslR, o Hsp15, se activa a elevadas temperaturas y aparece involucrada en el reciclaje de la subunidad 50S del ribosoma (Korber *et al.*, 2000).

Se ha observado que varias de las Hsp se comportan como antígenos superficiales, lo que podría parecer un contrasentido, teniendo en cuenta que el papel desempeñado como chaperonas debería implicar una localización intracelular. Sin embargo, se ha descrito que muchas de estas proteínas, además de actuar como chaperonas, presentan también otras funciones que pueden implicar una localización en la superficie y que además generalmente están relacionadas con la patogenicidad (Henderson *et al.*, 2006). Como ejemplo, se podría citar las DnaK y DnaJ, que parecen tener como función adicional la de mediar en la adhesión e invasión celular. No obstante, aunque según esta idea resultaría razonable estudiar estas proteínas como antígenos vacunales, realmente no serían las más adecuadas, debido a que a lo largo de la evolución, las Hsp se han mantenido muy conservadas, presentando bastante homología entre las de origen bacteriano y las de procedencia mamífera, por lo que su utilización como antígenos vacunales podría desencadenar enfermedades autoinmunitarias (Ghazaei, 2017).

5.3.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional

Con respecto al análisis de enriquecimiento funcional en condiciones miméticas a las de la infección natural, tan solo se observó un enriquecimiento significativo en el término de ontología génica GO:0003676, correspondiente a “unión a ácidos nucleicos”, donde se encontraron hasta 37 genes sobreexpresados. Esto sería consecuente con la importante reprogramación, tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional, al que es sometida la bacteria cuando sufre un estrés ambiental (Starosta *et al.*, 2014). Entre los 37 genes sobreexpresados, nos encontramos con seis codificantes de proteínas de unión a subunidades de ribosoma mas cuatro genes codificantes de enzimas relacionados con ARNts (nivel traduccional) y con ocho genes codificantes de reguladores transcripcionales (nivel transcripcional).

Entre los reguladores transcripcionales sobreexpresados destaca la proteína reguladora de captación de hierro (Fur por sus siglas en inglés), la cual forma un dímero en presencia de Fe^{+2} , que se une a regiones reguladoras de ADN, reprimiendo la expresión de genes relacionados con la toma de hierro; sin embargo, al escasear el hierro disponible, se deshace el dímero liberando el ADN y permitiendo así la transcripción de genes relacionados con la captura de hierro como receptores y siferóforos (Carpenter *et al.*, 2009).

Puede resultar paradójico que un regulador negativo de la adquisición de hierro resulte sobreexpresado en condiciones precisamente de restricción de hierro, pero durante los últimos años se han realizado diferentes hallazgos que demuestran que el papel de Fur no es tan sencillo como la ruta clásica que acabamos de relatar, si bien ésta sigue siendo completamente válida con respecto a la regulación de las proteínas necesarias para la captación de hierro. A día de hoy, se sabe que a lo largo de las diferentes especies bacterianas, el complejo formado entre el dímero de Fur y Fe^{+2} puede también regular positivamente otros genes diferentes a los de la ruta clásica, y que además, existen otros que pueden ser regulados positiva o negativamente por Fur sin formar complejo con Fe^{+2} . Algunos de los genes que se regulan de esta manera se encuentran relacionados con la respuesta a condiciones estresantes o con la virulencia (Carpenter *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta esta circunstancia, no resulta tan extraño la sobreexpresión de Fur en un ambiente con hierro restringido porque, precisamente a causa de la restricción, los complejos Fur- Fe^{+2} no se formarán y los mecanismos implicados en la captación de hierro no se verán reprimidos, sufriendo el efecto positivo o negativo de la regulación vía Fur

otros genes que pudieran estar relacionados con la supervivencia en condiciones estresantes o con la virulencia.

5.3.3. Subexpresión en condiciones miméticas

En el caso de genes subexpresados en condiciones miméticas que codifiquen proteínas cuya localización teórica sea la membrana externa o extracelular, aparecieron dos autotransportadores, dos proteínas hipotéticas que parecen tratarse de una β -galactosidasa y de la ATPasa de segregación de cromosoma, dos proteínas codificadas en fagos, una sialidasa que tras analizar mediante BLASTp se observó que era la neuraminidasa (NanH), y las proteínas ComE y PilA. Estas dos últimas están relacionadas con la captación de ADN desde el exterior a través de un pelo (*pilus*) de tipo IV y se ha observado que en *H. influenzae*, ambas proteínas, junto a otras que intervienen en la misma función, tienen su expresión regulada por un mismo regulón (Redfield *et al.*, 2005). Previamente, se había observado que el gen *pilA* resultaba sobreexpresado en condiciones de carencia de hierro (Xie *et al.*, 2009), por lo que al aparecer subexpresado en nuestro caso, parece indicar que el incremento de temperatura lo regula negativamente, incluso en condiciones de escasez de hierro.

En el análisis de enriquecimiento funcional de los genes subexpresados (sobreexpresados en condiciones normales), se observó que la mayoría de los términos enriquecidos presentaban relación con el metabolismo energético, con procesos que implicasen reacciones redox, o con ambos. En el caso del metabolismo energético, este descubrimiento concuerda con lo observado, referente a que en las condiciones miméticas se produce un frenado del crecimiento, el cual debería traducirse en una disminución general de los procesos metabólicos. En el caso de los procesos de oxidación-reducción, puede ser simplemente un reflejo de la disminución del crecimiento bacteriano y/o podría suceder que la bacteria, al detectar de algún modo la escasez de hierro, prefiera no malgastar energía en la producción de compuestos que no podrán desempeñar su función con normalidad, al escasear su principal factor limitante porque, como ya comentamos anteriormente, el hierro representa un elemento esencial para las reacciones redox (Parrow *et al.*, 2013).

6. CONCLUSIONES

- PRIMERA:** Las proteínas de la membrana externa P2, P5 y D15, producidas de forma recombinante a partir de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, son reconocidas específicamente por el suero procedente de cerdos previamente expuestos a la bacteria.
- SEGUNDA:** Las proteínas recombinantes P2, P5 y D15 producidas a partir de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, al ser inoculadas asépticamente en conejos y cerdos inducen anticuerpos específicos.
- TERCERA:** Las formulaciones vacunales preparadas a partir de las tres proteínas recombinantes, adyuvadas con Montanide IMS 2215 VG PR, tanto en forma individual como en preparaciones mixtas, no protegen en cerdos privados de calostro después de dos aplicaciones separadas tres semanas, cuando los animales son desafiados por vía intratraqueal con una dosis letal de 10^8 UFC de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*.
- CUARTA:** En cerdos padeciendo sepsis tras 24 horas de infección con la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, se aprecia que los niveles de expresión de los receptores TLR-2, Siglec-3 y CD163 sobre monocitos están significativamente más elevados que antes de la infección. Además parece existir una relación directa entre mayor expresión de CD163 y mayor expresión de TLR-2 y de Siglec-3.
- QUINTA:** En cerdos padeciendo sepsis tras 24 horas de infección con la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, se aprecia que los niveles de expresión de los receptores TLR-4, Siglec-1 y Siglec-5 sobre monocitos y de Siglec-10 sobre linfocitos, no sufren modificaciones significativas.
- SEXTA:** En cerdos padeciendo sepsis tras 24 horas de infección con la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, se observa que desaparece una subpoblación de monocitos CD163⁻/Siglec-1⁺, la cual está presente antes de la infección.

SÉPTIMA: El empleo de cerdos privados de calostro e infectados con *H. parasuis* se comporta como un buen modelo para profundizar en el estudio de los procesos sépticos.

OCTAVA: El estudio del transcriptoma de *H. parasuis* sometido *in vitro* a unas condiciones de temperatura y carencia de hierro similares a las existentes en el curso de la infección revela la sobreexpresión en su superficie de trece proteínas. Seis de ellas (TbpA, TbpB, TolC, HxuA, HxuB y HxuC) ya han sido probadas como antígenos vacunales en modelos de infección murino y/o porcino, mostrando una protección parcial. Las otras siete fueron FhuA, FimD, un autotransportador con un dominio serin-proteasa, una proteína con dominios con plegamiento tipo inmunoglobulina, otra proteína de gran tamaño con una repetición de tetratricopéptido y dos proteínas de pequeño tamaño sin presencia de dominios conocidos. Estas siete últimas proteínas, no probadas todavía, podrían constituir buenos antígenos vacunales al tener mayor probabilidad de localizarse en gran número sobre la superficie bacteriana durante la infección.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, J., M. Hong, S. Yoo, E. Lee, H. Won, I. Yoon, J. K. Jung, & H. Lee, 2012, Soluble expression of OmpA from *Haemophilus parasuis* in *Escherichia coli* and its protective effects in the mouse model of infection: *J Microbiol Biotechnol*, v. 22, p. 1307-9.
- Álvarez, B., Z. Escalona, H. Uenishi, D. Toki, C. Revilla, M. Yuste, M. G. Del Moral, F. Alonso, A. Ezquerra, & J. Dominguez, 2015, Molecular and functional characterization of porcine Siglec-3/CD33 and analysis of its expression in blood and tissues: *Dev Comp Immunol*, v. 51, p. 238-50.
- Álvarez, B., P. Martinez, M. Yuste, T. Poderoso, F. Alonso, J. Dominguez, A. Ezquerra, and C. Revilla, 2014, Phenotypic and functional heterogeneity of CD169(+) and CD163(+) macrophages from porcine lymph nodes and spleen: *Dev Comp Immunol*, v. 44, p. 44-9.
- Álvarez, B., C. Revilla, S. Chamorro, M. Lopez-Fraga, F. Alonso, J. Dominguez, & A. Ezquerra, 2006, Molecular cloning, characterization and tissue expression of porcine Toll-like receptor 4: *Dev Comp Immunol*, v. 30, p. 345-55.
- Álvarez, B., C. Revilla, N. Domenech, C. Perez, P. Martinez, F. Alonso, A. Ezquerra, & J. Domiguez, 2008, Expression of toll-like receptor 2 (TLR2) in porcine leukocyte subsets and tissues: *Vet Res*, v. 39, p. 13.
- Amano, H., M. Shibata, K. Takahashi, & Y. Sasaki, 1997, Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection: *J Vet Med Sci*, v. 59, p. 451-5.
- Angen, O., S. Oliveira, P. Ahrens, B. Svensmark, & T. D. Leser, 2007, Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*: *Vet Microbiol*, v. 119, p. 266-76.
- Aragón, V., M. Cerda-Cuellar, L. Fraile, M. Mombarg, M. Nofrarias, A. Olvera, M. Sibila, D. Solanes, & J. Segales, 2010, Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains: *Vet Microbiol*, v. 142, p. 387-93.

- Arce, C., M. Ramirez-Boo, C. Lucena, & J. J. Garrido, 2010, Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from *Salmonella typhimurium*: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 33, p. 161-74.
- Assavacheep, P., A. Assavacheep, & C. Turni, 2012, Detection of a putative hemolysin operon, hhdBA, of *Haemophilus parasuis* from pigs with Glasser disease: *J Vet Diagn Invest*, v. 24, p. 339-43.
- Barrow, A. D., & J. Trowsdale, 2006, You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling: *Eur J Immunol*, v. 36, p. 1646-53.
- Bello-Orti, B., V. Deslandes, Y. D. Tremblay, J. Labrie, K. J. Howell, A. W. Tucker, D. J. Maskell, V. Aragón, & M. Jacques, 2014, Biofilm formation by virulent and non-virulent strains of *Haemophilus parasuis*: *Vet Res*, v. 45, p. 104.
- Bello-Ortí, B., K. J. Howell, A. W. Tucker, D. J. Maskell, & V. Aragón, 2015, Metatranscriptomics reveals metabolic adaptation and induction of virulence factors by *Haemophilus parasuis* during lung infection, *Vet Res*, v. 46.
- Beran, O., R. Potmesil, & M. Holub, 2011, Differences in Toll-like receptor expression and cytokine production after stimulation with heat-killed Gram-positive and Gram-negative bacteria: *Folia Microbiol (Praha)*, v. 56, p. 283-7.
- Blackall, P. J., D. J. Trott, V. Rapp-Gabrielson, & D. J. Hampson, 1997, Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis: *Vet Microbiol*, v. 56, p. 125-34.
- Bodelon, G., C. Palomino, & L. A. Fernandez, 2013, Immunoglobulin domains in *Escherichia coli* and other enterobacteria: from pathogenesis to applications in antibody technologies: *FEMS Microbiol Rev*, v. 37, p. 204-50.
- Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. H. Schein, & W. J. Sibbald, 1992, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis: *Chest*, v. 101, p. 1644-1655.

- Bouchet, B., G. Vanier, M. Jacques, E. Auger, & M. Gottschalk, 2009, Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells: limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release: *Microb Pathog*, v. 46, p. 108-13.
- Bouchet, B., G. Vanier, M. Jacques, & M. Gottschalk, 2008, Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells: *Vet Res*, v. 39, p. 42.
- Boyd, C. R., S. J. Orr, S. Spence, J. F. Burrows, J. Elliott, H. P. Carroll, K. Brennan, J. Ni Gabhann, W. A. Coulter, C. Jones, P. R. Crocker, J. A. Johnston, & C. A. Jefferies, 2009, Siglec-E is up-regulated and phosphorylated following lipopolysaccharide stimulation in order to limit TLR-driven cytokine production: *J Immunol*, v. 183, p. 7703-9.
- Brockmeier, S. L., P. G. Halbur, and E. L. Thacker, 2002, *Porcine Respiratory Disease Complex*, in K. A. Brogden, & J. M. Guthmiller, eds., *Polymicrobial Diseases*: Washington (DC), ASM Press, p. 231-258.
- Brockmeier, S. L., C. L. Loving, M. A. Mullins, K. B. Register, T. L. Nicholson, B. S. Wiseman, R. B. Baker, & M. E. Kehrli, 2013, Virulence, Transmission, and Heterologous Protection of Four Isolates of *Haemophilus parasuis*, *Clin Vaccine Immunol*, v. 20, p. 1466-72.
- Carlin, A. F., A. L. Lewis, A. Varki, & V. Nizet, 2007, Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes: *J Bacteriol*, v. 189, p. 1231-7.
- Carpenter, B. M., J. M. Whitmire, & D. S. Merrell, 2009, This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis: *Infect Immun*, v. 77, p. 2590-601.
- Cerda-Cuellar, M., & V. Aragón, 2008, Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine: *Vet J*, v. 175, p. 384-9.

- Chamorro, S., C. Revilla, B. Álvarez, F. Alonso, A. Ezquerro, & J. Dominguez, 2005, Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation: *Immunology*, v. 114, p. 63-71.
- Chamorro, S., C. Revilla, B. Álvarez, L. Lopez-Fuertes, A. Ezquerro, & J. Dominguez, 2000, Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig: *Immunobiology*, v. 202, p. 82-93.
- Chang, Y. C., & V. Nizet, 2014, The interplay between Siglecs and sialylated pathogens: *Glycobiology*, v. 24, p. 818-25.
- Chen, Y., T. Liu, P. Langford, K. Hua, S. Zhou, Y. Zhai, H. Xiao, R. Luo, D. Bi, H. Jin, & R. Zhou, 2015a, *Haemophilus parasuis* induces activation of NF-kappaB and MAP kinase signaling pathways mediated by toll-like receptors: *Mol Immunol*, v. 65, p. 360-6.
- Chen, Y., S. Zhou, K. Hua, H. Xiao, Z. Li, M. Liu, R. Luo, D. Bi, R. Zhou, & H. Jin, 2015b, *Haemophilus parasuis* infection activates chemokine RANTES in PK-15 cells: *Mol Immunol*. v. 67, p. 661–666.
- Cope, L. D., Z. Hrkal, & E. J. Hansen, 2000, Detection of phase variation in expression of proteins involved in hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin binding by nontypeable *Haemophilus influenzae*: *Infect Immun*, v. 68, p. 4092-101.
- Costa-Hurtado, M., & V. Aragón, 2013, Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*: *Vet J*, v. 198, p. 571-6.
- Costa-Hurtado, M., A. Olvera, V. Martinez-Moliner, N. Galofre-Mila, P. Martinez, J. Dominguez, & V. Aragón, 2013, Changes in macrophage phenotype after infection of pigs with *Haemophilus parasuis* strains with different levels of virulence: *Infect Immun*, v. 81, p. 2327-33.
- Crocker, P. R., S. J. McMillan, & H. E. Richards, 2012, CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1253, p. 102-11.
- D'Andrea, L. D., & L. Regan, 2003, TPR proteins: the versatile helix: *Trends Biochem Sci*, v. 28, p. 655-62.

- Darwin, A. J., 2013, Stress Relief during Host Infection: The Phage Shock Protein Response Supports Bacterial Virulence in Various Ways: *PLoS Pathog*, v. 9.
- de la Fuente, A. J., C. B. Gutiérrez-Martín, J. I. Rodríguez-Barbosa, S. Martínez-Martínez, R. Frandoloso, F. Tejerina, & E. F. Rodríguez-Ferri, 2009, Blood cellular immune response in pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*: *Res Vet Sci*, v. 86, p. 230-4.
- de la Puente Redondo, V. A., J. Navas Méndez, N. García del Blanco, N. Ladron Boronat, C. B. Gutiérrez Martín, & E. F. Rodríguez Ferri, 2003, Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene: *Vet Microbiol*, v. 92, p. 253-62.
- Del Río, M. L., C. B. Gutiérrez, & E. F. Rodríguez Ferri, 2003, Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*: *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 880-2.
- del Río, M. L., C. B. Gutiérrez-Martín, J. I. Rodríguez-Barbosa, J. Navas, & E. F. Rodríguez-Ferri, 2005, Identification and characterization of the TonB region and its role in transferrin-mediated iron acquisition in *Haemophilus parasuis*: *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 45, p. 75-86.
- del Río, M. L., J. Navas, A. J. Martín, C. B. Gutiérrez, J. I. Rodríguez-Barbosa, & E. F. Rodríguez Ferri, 2006, Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*fhu*) genes and constitutive expression of the FhuA receptor: *Vet Res*, v. 37, p. 49-59.
- Duan, E., D. Wang, R. Luo, J. Luo, L. Gao, H. Chen, L. Fang, & S. Xiao, 2014, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection triggers HMGB1 release to promote inflammatory cytokine production: *Virology*, v. 468-470, p. 1-9.
- Escalona, Z., B. Álvarez, H. Uenishi, D. Toki, M. Yuste, C. Revilla, M. G. del Moral, F. Alonso, A. Ezquerro, & J. Dominguez, 2015, Molecular characterization of porcine Siglec-10 and analysis of its expression in blood and tissues: *Dev Comp Immunol*, v. 48, p. 116-23.

- Escalona, Z., B. Álvarez, H. Uenishi, D. Toki, M. Yuste, C. Revilla, M. Gomez del Moral, F. Alonso, A. Ezquerra, & J. Dominguez, 2014, Molecular characterization and expression of porcine Siglec-5: *Dev Comp Immunol*, v. 44, p. 206-16.
- Etzerodt, A., & S. K. Moestrup, 2013, CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects: *Antioxid Redox Signal*, v. 18, p. 2352-63.
- Ezquerra, A., C. Pérez, E. Ortuño, N. Gómez, M. García Briones, B. Álvarez, P. Martín de la Riva, F. Alonso, C. Revilla, & J. Domínguez, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid (España). Dept. de Biotecnología, 2008, Cloning and expression of porcine CD163: its use for characterization of monoclonal antibodies to porcine CD163 and development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids: *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 6.
- Fabriek, B. O., R. van Bruggen, D. M. Deng, A. J. Ligtenberg, K. Nazmi, K. Schornagel, R. P. Vloet, C. D. Dijkstra, & T. K. van den Berg, 2009, The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria: *Blood*, v. 113, p. 887-92.
- Fleming, P. J., D. S. Patel, E. L. Wu, Y. Qi, M. S. Yeom, M. C. Sousa, K. G. Fleming, & W. Im, 2016, BamA POTRA Domain Interacts with a Native Lipid Membrane Surface: *Biophys J*, v. 110, p. 2698-709.
- Frاندoloso, R., 2011a, Estudios moleculares e inmunobiológicos de la proteína TPBA (receptor de transferrina) de *Haemophilus parasuis* y de otras proteínas de membrana externa con afinidad por la transferrina porcina. Tesis Doctoral. Universidad de León, León.
- Frاندoloso, R., S. Martínez, E. F. Rodríguez-Ferri, M. J. García-Iglesias, C. Perez-Martínez, B. Martínez-Fernández, & C. B. Gutiérrez-Martín, 2011b, Development and characterization of protective *Haemophilus parasuis* subunit vaccines based on native proteins with affinity to porcine transferrin and comparison with other subunit and commercial vaccines: *Clin Vaccine Immunol*, v. 18, p. 50-8.

- Frاندoloso, R., S. Martínez-Martínez, C. Calmettes, J. Fegan, E. Costa, D. Curran, R. H. Yu, C. B. Gutiérrez-Martín, E. F. Rodríguez-Ferri, T. F. Moraes, & A. B. Schryvers, 2015a, Nonbinding site-directed mutants of transferrin binding protein B exhibit enhanced immunogenicity and protective capabilities: *Infect Immun*, v. 83, p. 1030-8.
- Frاندoloso, R., S. Martínez-Martínez, C. B. Gutiérrez-Martín, & E. F. Rodríguez-Ferri, 2012, *Haemophilus parasuis* serovar 5 Nagasaki strain adheres and invades PK-15 cells: *Vet Microbiol*, v. 154, p. 347-52.
- Frاندoloso, R., S. Martínez-Martínez, C. Calmettes, J. Fegan, E. Costa, D. Curran, R. Yu, C. B. Gutiérrez-Martín, E. F. Rodríguez-Ferri, T. F. Moraes, & A. B. Schryvers, 2015b, Nonbinding Site-Directed Mutants of Transferrin Binding Protein B Exhibit Enhanced Immunogenicity and Protective Capabilities, *Infect Immun*, v. 83, p. 1030-8.
- Frings, W., J. Dreier, & C. Sorg, 2002, Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect: *FEBS Lett*, v. 526, p. 93-6.
- Fu, S., F. Yuan, M. Zhang, C. Tan, H. Chen, & W. Bei, 2012, Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate dehydrogenase, of *Haemophilus parasuis*: *Res Vet Sci*, v. 93, p. 57-62.
- Fu, S., M. Zhang, J. Xu, J. Ou, Y. Wang, H. Liu, J. Liu, H. Chen, & W. Bei, 2013, Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Haemophilus parasuis* SH0165 putative outer membrane proteins: *Vaccine*, v. 31, p. 347-53.
- Galdiero, M., E. Finamore, F. Rossano, M. Gambuzza, M. R. Catania, G. Teti, A. Midiri, & G. Mancuso, 2004, *Haemophilus influenzae* porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages: *Infect Immun*, v. 72, p. 1204-9.
- Galofre-Mila, N., F. Correa-Fiz, S. Lacouture, M. Gottschalk, K. Strutzberg-Minder, A. Bensaid, S. Pina-Pedrero, & V. Aragón, 2017, A robust PCR for the differentiation of potential virulent strains of *Haemophilus parasuis*: *BMC Vet Res*, v. 13, p. 124.

- Geibel, S., & G. Waksman, 2014, The molecular dissection of the chaperone-usher pathway: *Biochim Biophys Acta*, v. 1843, p. 1559-67.
- Ghazaei, C., 2017, Role and mechanism of the Hsp70 molecular chaperone machines in bacterial pathogens: *J Med Microbiol*, v. 66, p. 259-265.
- Ghosh, S., & C. K. Chan, 2016, Analysis of RNA-Seq Data Using TopHat and Cufflinks: *Methods Mol Biol*, v. 1374, p. 339-61.
- Goethe, R., O. F. Gonzales, T. Lindner, & G. F. Gerlach, 2000, A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction: *Vaccine*, v. 19, p. 966-75.
- Gonzalez Plaza, J. J., N. Hulak, Z. Zhumadilov, & A. Akilzhanova, 2016, Fever as an important resource for infectious diseases research: *Intractable Rare Dis Res*, v. 5, p. 97-102.
- Gonzalez-Beiras, C., M. Marks, C. Y. Chen, S. Roberts, & O. Mitja, 2016, Epidemiology of *Haemophilus ducreyi* Infections: *Emerg Infect Dis*, v. 22, p. 1-8.
- Goon, S., B. Schilling, M. V. Tullius, B. W. Gibson, & C. R. Bertozzi, 2003, Metabolic incorporation of unnatural sialic acids into *Haemophilus ducreyi* lipooligosaccharides: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 3089-94.
- Gottschalk, M., 2011, *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis*. Aspectos clínicos de su interacción, epidemiología y terapéutica.: *Virbac al día Porcinos*, v. 17.
- Henderson, B., E. Allan, & A. R. Coates, 2006, Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection: *Infect Immun*, v. 74, p. 3693-706.
- Hill, C. E., D. S. Metcalf, & J. I. MacInnes, 2003, A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR: *Vet Microbiol*, v. 96, p. 189-202.
- Hoefling, D. C., 1994, The various forms of *Haemophilus parasuis*: *Swine health and production*, v. 2, p. 19.

- Hoffmann, A., M. Richter, S. von Grafenstein, E. Walther, Z. Xu, L. Schumann, U. Grienke, C. E. Mair, C. Kramer, J. M. Rollinger, K. R. Liedl, M. Schmidtke, & J. Kirchmair, 2017, Discovery and Characterization of Diazenylaryl Sulfonic Acids as Inhibitors of Viral and Bacterial Neuraminidases: *Front Microbiol*, v. 8, p. 205.
- Howell, K. J., S. E. Peters, J. Wang, J. Hernandez-Garcia, L. A. Weinert, S. L. Luan, R. R. Chaudhuri, O. Angen, V. Aragón, S. M. Williamson, J. Parkhill, P. R. Langford, A. N. Rycroft, B. W. Wren, D. J. Maskell, & A. W. Tucker, 2015, Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Molecular Serotyping of *Haemophilus parasuis*: *J Clin Microbiol*, v. 53, p. 3812-21.
- Howell, K. J., L. A. Weinert, S. E. Peters, J. Wang, J. Hernandez-Garcia, R. R. Chaudhuri, S. L. Luan, O. Angen, V. Aragón, S. M. Williamson, P. R. Langford, A. N. Rycroft, B. W. Wren, D. J. Maskell, & A. W. Tucker, 2017, A "pathotyping" multiplex PCR for *Haemophilus parasuis*: a tool for the prediction of virulence: *J Clin Microbiol*. doi:10.1128/JCM.02464-16
- Hu, M., Y. Zhang, F. Xie, G. Li, J. Li, W. Si, S. Liu, S. Hu, Z. Zhang, N. Shen, & C. Wang, 2013, Protection of piglets by a *Haemophilus parasuis* ghost vaccine against homologous challenge: *Clin Vaccine Immunol*, v. 20, p. 795-802.
- Huang, X., Y. Li, Y. Fu, Y. Ji, K. Lian, H. Zheng, J. Wei, X. Cai, & Q. Zhu, 2013, Cross-protective efficacy of recombinant transferrin-binding protein A of *Haemophilus parasuis* in guinea pigs: *Clin Vaccine Immunol*, v. 20, p. 912-9.
- Izquierdo-Useros, N., M. Lorizate, M. C. Puertas, M. T. Rodriguez-Plata, N. Zangger, E. Erikson, M. Pino, I. Erkizia, B. Glass, B. Clotet, O. T. Keppler, A. Telenti, H. G. Krausslich, & J. Martinez-Picado, 2012, Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides: *PLoS Biol*, v. 10, p. e1001448.
- Jellusova, J., & L. Nitschke, 2011, Regulation of B cell functions by the sialic acid-binding receptors siglec-G and CD22: *Front Immunol*, v. 2, p. 96.

- Jin, H., Y. Wan, R. Zhou, L. Li, R. Luo, S. Zhang, J. Hu, P. R. Langford, & H. Chen, 2008, Identification of genes transcribed by *Haemophilus parasuis* in necrotic porcine lung through the selective capture of transcribed sequences (SCOTS): *Environ Microbiol*, v. 10, p. 3326-36.
- Juge, N., L. Tailford, & C. D. Owen, 2016, Sialidases from gut bacteria: a mini-review: *Biochem Soc Trans*, v. 44, p. 166-75.
- Kang, I., D. Kim, K. Han, H. W. Seo, Y. Oh, C. Park, J. Lee, M. Gottschalk, & C. Chae, 2012, Optimized protocol for multiplex nested polymerase chain reaction to detect and differentiate *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from pigs with polyserositis, *Can J Vet Res*, v. 76, p. 195-200.
- Kawai, T., & S. Akira, 2010, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors: *Nat Immunol*, v. 11, p. 373-84.
- Kielstein, P., & V. J. Rapp-Gabrielson, 1992, Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts: *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 862-5.
- Kneidl, J., B. Löffler, M. C. Erat, J. Kalinka, G. Peters, J. Roth, & K. Barczyk, 2012, Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides: *Cell Microbiol*, v. 14, p. 914-36.
- Koga, M., M. Gilbert, J. Li, S. Koike, M. Takahashi, K. Furukawa, K. Hirata, & N. Yuki, 2005, Antecedent infections in Fisher syndrome: a common pathogenesis of molecular mimicry: *Neurology*, v. 64, p. 1605-11.
- Korber, P., J. M. Stahl, K. H. Nierhaus, & J. C. Bardwell, 2000, Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein: *Embo j*, v. 19, p. 741-8.
- Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, & C. Hughes, 2000, Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export: *Nature*, v. 405, p. 914-9.

- Kufer, T. A., D. J. Banks, & D. J. Philpott, 2006, Innate immune sensing of microbes by Nod proteins: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1072, p. 19-27.
- Kuhnert, P., M. Bisgaard, B. M. Korczak, S. Schwendener, H. Christensen, & J. Frey, 2012, Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry: *J Microbiol Methods*, v. 89, p. 1-7.
- Langemann, T., V. J. Koller, A. Muhammad, P. Kudela, U. B. Mayr, & W. Lubitz, 2010, The bacterial ghost platform system: Production and applications, *Bioeng Bugs*, v. 1, p. 326-36.
- Langereis, J. D., & M. I. de Jonge, 2015, Invasive Disease Caused by Nontypeable *Haemophilus influenzae*: *Emerg Infect Dis*, v. 21, p. 1711-8.
- Lawrence, P., & R. Bey, 2015, Map-based comparative genomic analysis of virulent *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5: *J Genomics*, v. 3, p. 59-71.
- Lawrence, P. K., B. L. Wiener, T. Kolander-Bremer, R. F. Bey, D. L. Stine, W. Kittichotirat, & R. E. Bumgarner, 2014, Genome-Wide Association Studies of Virulent and Avirulent *Haemophilus parasuis* Serotype 4 Strains: *Genome Announc*, v. 2.
- Lee, S. K., & J. L. Ding, 2013, A perspective on the role of extracellular hemoglobin on the innate immune system: *DNA Cell Biol*, v. 32, p. 36-40.
- Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, G. Ramsay, & C. Int Sepsis Definitions, 2003, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference: *Critical Care Medicine*, v. 31, p. 1250-1256.
- Ley, K., 2003, The role of selectins in inflammation and disease: *Trends Mol Med*, v. 9, p. 263-8.
- Li, M., R. J. Cai, S. Song, Z. Y. Jiang, Y. Li, H. C. Gou, P. P. Chu, C. L. Li, & H. J. Qiu, 2017, Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of recombinant outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in a murine model: *PLoS One*, v. 12, p. e0176537.

- Li, P., J. Bai, J. X. Li, G. L. Zhang, Y. H. Song, Y. F. Li, X. W. Wang, & P. Jiang, 2012, Molecular cloning, sequencing, and expression of the outer membrane protein P2 gene of *Haemophilus parasuis*: *Res Vet Sci*, v. 93, p. 736-42.
- Li, W., B. P. Katz, & S. M. Spinola, 2011, *Haemophilus ducreyi* Lipooligosaccharides Induce Expression of the Immunosuppressive Enzyme Indoleamine 2,3-Dioxygenase via Type I Interferons and Tumor Necrosis Factor Alpha in Human Dendritic Cells, *Infect Immun*, v. 79, p. 3338-47.
- Lichtensteiger, C. A., & E. R. Vimr, 1997, Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*: *FEMS Microbiol Lett*, v. 152, p. 269-74.
- Lichtensteiger, C. A., & E. R. Vimr, 2003, Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis*: *Vet Microbiol*, v. 93, p. 79-87.
- Liu, H., Q. Xue, Q. Zeng, & Z. Zhao, 2016, *Haemophilus parasuis* vaccines: *Vet Immunol Immunopathol*, v. 180, p. 53-58.
- Liu, M., C. M. John, & G. A. Jarvis, 2010, Phosphoryl moieties of lipid A from *Neisseria meningitidis* and *N. gonorrhoeae* lipooligosaccharides play an important role in activation of both MyD88- and TRIF-dependent TLR4-MD-2 signaling pathways: *J Immunol*, v. 185, p. 6974-84.
- Macauley, M. S., P. R. Crocker, & J. C. Paulson, 2014, Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease: *Nat Rev Immunol*, v. 14, p. 653-66.
- Macêdo, N. R. d., S. R. Oliveira, A. P. Lage, & R. M. C. Guedes, 2009, Molecular epidemiology of *Haemophilus parasuis*: *Cienc. Rural*, v. 39, p. 2576-2582.
- Martín de la Fuente, A. j., 2007. Estudios de inmunidad en cerdos frente a *Haemophilus parasuis*. Tesis Doctoral. Universidad de León, León.
- Martín de la Fuente, A. J., R. Carpintero, E. F. Rodriguez Ferri, M. A. Alava, F. Lampreave, & C. B. Gutierrez Martin, 2010, Acute-phase protein response in pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 33, p. 455-65.

- Martín de la Fuente, A. J., C. B. Gutierrez Martín, C. Perez Martínez, M. J. García Iglesias, F. Tejerina, & E. F. Rodríguez Ferri, 2009, Effect of different vaccine formulations on the development of Glasser's disease induced in pigs by experimental *Haemophilus parasuis* infection: *J Comp Pathol*, v. 140, p. 169-76.
- Martínez-Martínez, S., 2011. Respuesta de fase aguda y estudio de la inmunidad humoral en cerdos vacunados con diferentes formulaciones frente a *Haemophilus parasuis*: Tesis Doctoral. Universidad de León, León.
- Martínez-Martínez, S., R. Frandoloso, E. F. Rodríguez Ferri, C. Gil, C. Hernandez-Haro, S. Yubero, & C. B. Gutiérrez Martín, 2013, Immunoproteomic analysis of the protective response obtained with subunit and commercial vaccines against Glasser's disease in pigs: *Vet Immunol Immunopathol*, v. 151, p. 235-47.
- Martínez-Martínez, S., E. F. Rodríguez-Ferri, R. Frandoloso, J. J. Garrido-Pavón, S. Zaldívar-Lopez, C. Barreiro, & C. B. Gutiérrez-Martín, 2016, Molecular analysis of lungs from pigs immunized with a mutant transferrin binding protein B-based vaccine and challenged with *Haemophilus parasuis*: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 48, p. 69-78.
- Martínez-Moliner, V., P. Soler-Llorens, J. Moleres, J. Garmendia, & V. Aragón, 2012, Distribution of genes involved in sialic acid utilization in strains of *Haemophilus parasuis*: *Microbiology*, v. 158, p. 2117-24.
- Martín de la Fuente, A. J., A. W. Tucker, J. Navas, M. Blanco, S. J. Morris, & C. B. Gutierrez-Martin, 2007, Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain: *Vet Microbiol*, v. 120, p. 184-91.
- Matsuda, N., & Y. Hattori, 2006, Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy: *J Pharmacol Sci*, v. 101, p. 189-98.
- McCaig, W. D., C. L. Loving, H. R. Hughes, & S. L. Brockmeier, 2016, Characterization and Vaccine Potential of Outer Membrane Vesicles Produced by *Haemophilus parasuis*: *PLoS One*, v. 11, p. e0149132.

- Melnikow, E., S. Dornan, C. Sargent, M. Duszenko, G. Evans, N. Gunkel, P. M. Selzer, & H. J. Ullrich, 2005, Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under in vitro growth conditions mimicking the in vivo environment: *Vet Microbiol*, v. 110, p. 255-63.
- Meri, S., 2016, Self-nonsel self discrimination by the complement system: *FEBS Lett*, v. 590, p. 2418-34.
- Mikael, L. G., P. D. Pawelek, J. Labrie, M. Sirois, J. W. Coulton, & M. Jacques, 2002, Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (fhu) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: *Microbiology*, v. 148, p. 2869-82.
- Miniats, O. P., N. L. Smart, & E. Ewert, 1991, Vaccination of gnotobiotic primary specific pathogen-free pigs against *Haemophilus parasuis*: *Can J Vet Res*, v. 55, p. 33-6.
- Moller, H. J., M. J. Nielsen, M. B. Maniecki, M. Madsen, & S. K. Moestrup, 2010, Soluble macrophage-derived CD163: a homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin-hemoglobin binding: *Immunobiology*, v. 215, p. 406-12.
- Moran, A. P., M. M. Prendergast, & B. J. Appelmelk, 1996, Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease: *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 16, p. 105-15.
- Moreno, L. Z., G. F. Silva, V. T. Gomes, C. E. Matajira, A. P. Silva, R. E. Mesquita, N. P. Lotto, T. S. Ferreira, A. P. Christ, M. I. Sato, Y. Gherpelli, M. Dottori, P. Bonilauri, A. Luppi, & A. M. Moreno, 2016, Application of protein profiling of virulent *Haemophilus parasuis* by MALDI-TOF mass spectrometry: *J Infect Dev Ctries*, v. 10, p. 678-81.
- Morozumi, T., T. Hiramune, and K. Kobayashi, 1982, Experimental infections of mice & guinea pigs with *Haemophilus parasuis*: *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, v. 22, p. 23-31.

- Morozumi, T., & J. Nicolet, 1986, Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains: *J Clin Microbiol*, v. 23, p. 138-42.
- Morton, D. J., T. W. Seale, L. L. Madore, T. M. VanWagoner, P. W. Whitby, & T. L. Stull, 2007, The haem-haemopexin utilization gene cluster (hxuCBA) as a virulence factor of *Haemophilus influenzae*: *Microbiology*, v. 153, p. 215-24.
- Mullins, M. A., K. B. Register, D. O. Bayles, C. L. Loving, T. L. Nicholson, S. L. Brockmeier, D. W. Dyer, & G. J. Phillips, 2009, Characterization and comparative analysis of the genes encoding *Haemophilus parasuis* outer membrane proteins P2 and P5: *J Bacteriol*, v. 191, p. 5988-6002.
- Munch, S., S. Grund, & M. Kruger, 1992, Fimbriae and membranes on *Haemophilus parasuis*: *Zentralbl Veterinarmed B*, v. 39, p. 59-64.
- Nardy, A. F., C. G. Freire-de-Lima, A. R. Perez, & A. Morrot, 2016, Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance: *Front Microbiol*, v. 7, p. 348.
- Nedbalcova, K., P. Satran, Z. Jaglic, R. Ondriasova, & Z. Kucerova, 2006, *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review: *Veterinarni Medicina*, v. 51, p. 168-179.
- Nielsen, R., 1993, Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes: *Acta Vet Scand*, v. 34, p. 193-8.
- Noinaj, N., N. C. Easley, M. Oke, N. Mizuno, J. Gumbart, E. Boura, A. N. Steere, O. Zak, P. Aisen, E. Tajkhorshid, R. W. Evans, A. R. Gorringer, A. B. Mason, A. C. Steven, & S. K. Buchanan, 2012, Structural basis for iron piracy by pathogenic *Neisseria*: *Nature*, v. 483, p. 53-8.
- Nordvang, R. T., C. Nyffenegger, J. Holck, C. Jers, B. Zeuner, U. K. Sundekilde, A. S. Meyer, & J. D. Mikkelsen, 2016, It All Starts with a Sandwich: Identification of Sialidases with Trans-Glycosylation Activity: *PLoS One*, v. 11, p. e0158434.
- Odeh, M., 1996, Sepsis, septicaemia, sepsis syndrome, and septic shock: the correct definition and use: *Postgrad Med J*, v. 72, p. 66.

- Oldfield, N. J., K. E. Worrall, A. N. Rycroft, T. Ali, K. G. Wooldridge, & D. A. Ala'Aldeen, 2009, AasP autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not protect pigs against homologous challenge: *Vaccine*, v. 27, p. 5278-83.
- Oliveira, S., 2004, Improving rate of success in isolating *Haemophilus parasuis* from clinical samples: *Journal of Swine Health and Production*, v. 12, p. 308-309.
- Oliveira, S., 2007, *Haemophilus parasuis* diagnostics: *Journal of Swine Health and Production*, v. 15, p. 99-103.
- Oliveira, S., P. J. Blackall, & C. Pijoan, 2003, Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping: *Am J Vet Res*, v. 64, p. 435-42.
- Oliveira, S., L. Galina, & C. Pijoan, 2001, Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections: *J Vet Diagn Invest*, v. 13, p. 495-501.
- Oliveira, S., & C. Pijoan, 2002, Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease: *Journal of Swine Health and Production*, v. 10, p. 221-225.
- Oliveira, S., & C. Pijoan, 2004, *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control: *Vet Microbiol*, v. 99, p. 1-12.
- Olvera, A., M. Ballester, M. Nofrarias, M. Sibila, & V. Aragón, 2009, Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains: *Vet Res*, v. 40, p. 24.
- Olvera, A., S. Pina, N. Macedo, S. Oliveira, V. Aragón, & A. Bensaid, 2012, Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (vtaA): *Vet J*, v. 191, p. 213-8.
- Olvera, A., S. Pina, M. Perez-Simo, V. Aragón, J. Segales, & A. Bensaid, 2011, Immunogenicity and protection against *Haemophilus parasuis* infection after vaccination with recombinant virulence associated trimeric autotransporters (VtaA): *Vaccine*, v. 29, p. 2797-802.

- Olvera, A., S. Pina, M. Pérez-Simó, S. Oliveira, & A. Bensaid, 2010, Virulence-associated trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis* are antigenic proteins expressed in vivo, *Vet Res*, v. 41.
- Ondrackova, P., L. Leva, Z. Kucerova, M. Vicenova, M. Mensikova, & M. Faldyna, 2013, Distribution of porcine monocytes in different lymphoid tissues and the lungs during experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and the role of chemokines: *Vet Res*, v. 44, p. 98.
- Ondrackova, P., K. Nechvatalova, Z. Kucerova, L. Leva, J. Dominguez, & M. Faldyna, 2010, Porcine mononuclear phagocyte subpopulations in the lung, blood and bone marrow: dynamics during inflammation induced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*: *Vet Res*, v. 41, p. 64.
- Onofre, G., M. Kolackova, K. Jankovicova, & J. Krejsek, 2009, Scavenger receptor CD163 and its biological functions: *Acta Medica (Hradec Kralove)*, v. 52, p. 57-61.
- Osvaldova, A., H. Stepanova, M. Faldyna, & J. Matiasovic, 2017, Gene expression values of pattern-recognition receptors in porcine leukocytes and their response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection: *Res Vet Sci*, v. 114, p. 31-35.
- Palmer, K. L., A. C. Thornton, K. R. Fortney, A. F. Hood, R. S. Munson, Jr., & S. M. Spinola, 1998, Evaluation of an isogenic hemolysin-deficient mutant in the human model of *Haemophilus ducreyi* infection: *J Infect Dis*, v. 178, p. 191-9.
- Parrow, N. L., R. E. Fleming, & M. F. Minnick, 2013, Sequestration and scavenging of iron in infection: *Infect Immun*, v. 81, p. 3503-14.
- Peet, R. L., J. Fry, J. Lloyd, J. Henderson, J. Curran, & D. Moir, 1983, *Haemophilus parasuis* septicaemia in pigs: *Aust Vet J*, v. 60, p. 187.

- Pina, S., A. Olvera, A. Barcelo, & A. Bensaid, 2009, Trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis*: generation of an extensive passenger domain repertoire specific for pathogenic strains: *J Bacteriol*, v. 191, p. 576-87.
- Poderoso, T., P. Martinez, B. Álvarez, A. Handler, S. Moreno, F. Alonso, A. Ezquerra, J. Dominguez, & C. Revilla, 2011, Delivery of antigen to sialoadhesin or CD163 improves the specific immune response in pigs: *Vaccine*, v. 29, p. 4813-20.
- Preston, A., R. E. Mandrell, B. W. Gibson, & M. A. Apicella, 1996, The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria: *Crit Rev Microbiol*, v. 22, p. 139-80.
- Pérez, C., A. Ezquerra, E. Ortuño, N. Gómez, M. García-Briones, P. M. d. l. Riva, F. Alonso, C. Revilla, & J. Domínguez, 2008, Cloning and expression of porcine CD163: its use for characterization of monoclonal antibodies to porcine CD163 and development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids: *Span. J. Agric. Res.*, v. 6.
- Quinn, P. J., B. K. Markey, F. C. Leonard, P. Hartigan, S. Fanning, & E. S. Fitzpatrick. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2^a ed. Oxford; Wiley-Blackwell.
- Redfield, R. J., A. D. Cameron, Q. Qian, J. Hinds, T. R. Ali, J. S. Kroll, & P. R. Langford, 2005, A novel CRP-dependent regulon controls expression of competence genes in *Haemophilus influenzae*: *J Mol Biol*, v. 347, p. 735-47.
- Reiner, G., C. Fresen, S. Bronnert, I. Haack, & H. Willems, 2010, Prevalence of *Haemophilus parasuis* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany: *European journal of wildlife research*, v. 56, p. 815-818.
- Revilla, C., T. Poderoso, P. Martinez, B. Álvarez, L. Lopez-Fuertes, F. Alonso, A. Ezquerra, & J. Dominguez, 2009, Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells: *Vet Res*, v. 40, p. 14.

- Rodríguez Ferri, E. F., C. B. Gutiérrez Martín, V. de la Puente, M. García Blanco, J. Navas, M. C. Paniagua, M. L. del Río, J. L. Monter, & N. García de la Fuente, 2000, Meningitis bacterianas en el cerdo: Enfermedad de Glässer: *Porci*, v. 59, p. 43-60.
- Ruddock, L. W., & P. Klappa, 1999, Oxidative stress: Protein folding with a novel redox switch: *Curr Biol*, v. 9, p. R400-2.
- Ruiz, A., S. Oliveira, M. Torremorell, & C. Pijoan, 2001, Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites: *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 1757-62.
- Sack, M., & N. Baltes, 2009, Identification of novel potential virulence-associated factors in *Haemophilus parasuis*: *Vet Microbiol*, v. 136, p. 382-6.
- Sanchez, C., N. Domenech, J. Vazquez, F. Alonso, A. Ezquerra, & J. Dominguez, 1999, The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation: *J Immunol*, v. 162, p. 5230-7.
- Savva, A., & T. Roger, 2013, Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases: *Front Immunol*, v. 4, p. 387.
- Schauer, R., 2009, Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions: *Curr Opin Struct Biol*, v. 19, p. 507-14.
- Schroder, K., & J. Tschopp, 2010, The inflammasomes: *Cell*, v. 140, p. 821-32.
- Sette, A., & R. Rappuoli, 2010, Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics: *Immunity*, v. 33, p. 530-41.
- Shuto, T., A. Imasato, H. Jono, A. Sakai, H. Xu, T. Watanabe, D. D. Rixter, H. Kai, A. Andalibi, F. Linthicum, Y. L. Guan, J. Han, A. C. Cato, D. J. Lim, S. Akira, & J. D. Li, 2002, Glucocorticoids synergistically enhance nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced Toll-like receptor 2 expression via a negative cross-talk with p38 MAP kinase: *J Biol Chem*, v. 277, p. 17263-70.

- Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent, & D. C. Angus, 2016, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3): *Jama-Journal of the American Medical Association*, v. 315, p. 801-810.
- Smart, N. L., D. Hurnik, & J. I. Macinnes, 1993, An investigation of enzootic Glasser's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis: *Can Vet J*, v. 34, p. 487-90.
- Smart, N. L., O. P. Miniats, S. Rosendal, & R. M. Friendship, 1989, Glasser's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in southern Ontario: *Can Vet J*, v. 30, p. 339-43.
- Snoeck, V., I. R. Peters, & E. Cox, 2006, The IgA system: a comparison of structure and function in different species: *Vet Res*, v. 37, p. 455-67.
- Solano-Aguilar, G. I., C. Pijoan, V. Rapp-Gabrielson, J. Collins, L. F. Carvalho, & N. Winkelman, 1999, Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection: *Am J Vet Res*, v. 60, p. 81-7.
- Song, X. M., A. Forsgren, & H. Janson, 1999, Fragmentation heterogeneity of 23S ribosomal RNA in *Haemophilus* species: *Gene*, v. 230, p. 287-93.
- Starosta, A. L., J. Lassak, K. Jung, & D. N. Wilson, 2014, The bacterial translation stress response: *FEMS Microbiol Rev*, v. 38, p. 1172-201.
- Szczesny, P., & A. Lupas, 2008, Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins-daTAA: *Bioinformatics*, v. 24, p. 1251-6.
- Tadjine, M., K. R. Mittal, S. Bourdon, & M. Gottschalk, 2004, Development of a New Serological Test for Serotyping *Haemophilus parasuis* Isolates and Determination of Their Prevalence in North America, *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 839-40.

- Takahashi, K., S. Naga, T. Yagihashi, T. Ikehata, Y. Nakano, K. Senna, T. Maruyama, & J. Murofushi, 2001, A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions: *J Vet Med Sci*, v. 63, p. 487-91.
- Takeuchi, O., & S. Akira, 2010, Pattern recognition receptors and inflammation: *Cell*, v. 140, p. 805-20.
- Tascon, R. I., J. A. Vazquez-Boland, C. B. Gutierrez-Martin, I. Rodriguez-Barbosa, & E. F. Rodriguez-Ferri, 1994, The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis: *Mol Microbiol*, v. 14, p. 207-16.
- Tegetmeyer, H. E., K. Fricke, & N. Baltés, 2009, An isogenic *Actinobacillus pleuropneumoniae* AasP mutant exhibits altered biofilm formation but retains virulence: *Vet Microbiol*, v. 137, p. 392-6.
- Traving, C., & R. Schauer, 1998, Structure, function and metabolism of sialic acids: *Cell Mol Life Sci*, v. 54, p. 1330-49.
- Turni, C., & P. J. Blackall, 2011, An unusual strain of *Haemophilus parasuis* that fails to react in a species-specific polymerase chain reaction assay: *J Vet Diagn Invest*, v. 23, p. 355-8.
- Turni, C., M. Pyke, & P. J. Blackall, 2010, Validation of a real-time PCR for *Haemophilus parasuis*: *J Appl Microbiol*, v. 108, p. 1323-31.
- Uddin, M. J., P. K. Nuro-Gyina, M. A. Islam, D. Tesfaye, E. Tholen, C. Looft, K. Schellander, & M. U. Cinar, 2012, Expression dynamics of Toll-like receptors mRNA and cytokines in porcine peripheral blood mononuclear cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide: *Vet Immunol Immunopathol*, v. 147, p. 211-22.
- Uematsu, S., S. Sato, M. Yamamoto, T. Hirotani, H. Kato, F. Takeshita, M. Matsuda, C. Coban, K. J. Ishii, T. Kawai, O. Takeuchi, & S. Akira, 2005, Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction: *J Exp Med*, v. 201, p. 915-23.

- Uenishi, H., & H. Shinkai, 2009, Porcine Toll-like receptors: the front line of pathogen monitoring and possible implications for disease resistance: *Dev Comp Immunol*, v. 33, p. 353-61.
- Wang, X., X. Xu, Y. Wu, L. Li, R. Cao, X. Cai, & H. Chen, 2013, Polysaccharide biosynthesis protein CapD is a novel pathogenicity-associated determinant of *Haemophilus parasuis* involved in serum-resistance ability: *Vet Microbiol*, v. 164, p. 184-9.
- Weaver, L. K., P. A. Pioli, K. Wardwell, S. N. Vogel, & P. M. Guyre, 2007, Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors: *J Leukoc Biol*, v. 81, p. 663-71.
- Wei, X., S. Cao, L. Zhang, X. Wen, Y. Wen, R. Wu, X. Huang, Y. Huang, & Q. Yan, 2014, Comparative proteome analysis of the extracellular proteins of two *Haemophilus parasuis* strains Nagasaki and SW114: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 446, p. 997-1001.
- Wen, Y., X. Yan, S. Cao, L. He, L. Ding, L. Zhang, P. Zhou, X. Huang, R. Wu, & X. Wen, 2016, Immunogenicity of the recombinant HxuCBA proteins encoded by hxuCBA gene cluster of *Haemophilus parasuis* in mice: *Gene*, v. 591, p. 478-83.
- Wiersinga, W. J., S. J. Leopold, D. R. Cranendonk, & T. van der Poll, 2014, Host innate immune responses to sepsis: *Virulence*, v. 5, p. 36-44.
- Xie, Q., H. Jin, R. Luo, Y. Wan, J. Chu, H. Zhou, B. Shi, H. Chen, & R. Zhou, 2009, Transcriptional responses of *Haemophilus parasuis* to iron-restriction stress in vitro: *Biometals*, v. 22, p. 907-16.
- Xu, Z., M. Yue, R. Zhou, Q. Jin, Y. Fan, W. Bei, & H. Chen, 2011, Genomic characterization of *Haemophilus parasuis* SH0165, a highly virulent strain of serovar 5 prevalent in China: *PLoS One*, v. 6, p. e19631.

- Yang, H., H. Wang, Y. A. Levine, M. K. Gunasekaran, Y. Wang, M. Addorisio, S. Zhu, W. Li, J. Li, D. P. de Kleijn, P. S. Olofsson, H. S. Warren, M. He, Y. Al-Abed, J. Roth, D. J. Antoine, S. S. Chavan, U. Andersson, & K. J. Tracey, 2016, Identification of CD163 as an antiinflammatory receptor for HMGB1-haptoglobin complexes: *JCI Insight*, v. 1.
- Yang, Z., L. Zhang, Y. Zhang, T. Zhang, Y. Feng, X. Lu, W. Lan, J. Wang, H. Wu, C. Cao, & X. Wang, 2011, Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method: *PLoS One*, v. 6, p. e22981.
- Yuan, F., S. Fu, J. Hu, J. Li, H. Chang, L. Hu, H. Chen, Y. Tian, & W. Bei, 2012, Evaluation of recombinant proteins of *Haemophilus parasuis* strain SH0165 as vaccine candidates in a mouse model: *Res Vet Sci*, v. 93, p. 51-6.
- Yue, M., F. Yang, J. Yang, W. Bei, X. Cai, L. Chen, J. Dong, R. Zhou, M. Jin, Q. Jin, & H. Chen, 2009, Complete genome sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165: *J Bacteriol*, v. 191, p. 1359-60.
- Yuste, M., T. Fernandez-Caballero, C. Prieto, B. Álvarez, J. Martinez-Lobo, I. Simarro, J. M. Castro, F. Alonso, A. Ezquerro, J. Dominguez, & C. Revilla, 2017, Splenic CD163+ macrophages as targets of porcine reproductive and respiratory virus: Role of Siglecs: *Vet Microbiol*, v. 198, p. 72-80.
- Zehr, E. S., D. V. Lavrov, & L. B. Tabatabai, 2012, Comparison of *Haemophilus parasuis* reference strains and field isolates by using random amplified polymorphic DNA and protein profiles, *BMC Microbiol*, v. 12, p. 108.
- Zhang, B., S. Feng, C. Xu, S. Zhou, Y. He, L. Zhang, J. Zhang, L. Guo, & M. Liao, 2012a, Serum resistance in *Haemophilus parasuis* SC096 strain requires outer membrane protein P2 expression: *FEMS Microbiol Lett*, v. 326, p. 109-15.
- Zhang, B., Y. He, C. Xu, L. Xu, S. Feng, M. Liao, & T. Ren, 2012b, Cytolethal distending toxin (CDT) of the *Haemophilus parasuis* SC096 strain contributes to serum resistance and adherence to and invasion of PK-15 and PUVEC cells: *Vet Microbiol*, v. 157, p. 237-42.

- Zhang, B., C. Tang, M. Liao, & H. Yue, 2014, Update on the pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection and virulence factors: *Vet Microbiol*, v. 168, p. 1-7.
- Zhang, B., C. Xu, & M. Liao, 2012c, Outer membrane protein P2 of the *Haemophilus parasuis* SC096 strain contributes to adherence to porcine alveolar macrophages cells, *Vet Microbiol*, v. 158: Netherlands, p. 226-7.
- Zhang, B., C. Xu, L. Zhang, S. Zhou, S. Feng, Y. He, & M. Liao, 2013, Enhanced adherence to and invasion of PUVEC and PK-15 cells due to the overexpression of RfaD, ThyA and Mip in the DeltaompP2 mutant of *Haemophilus parasuis* SC096 strain: *Vet Microbiol*, v. 162, p. 713-23.
- Zhang, B., C. Xu, S. Zhou, S. Feng, L. Zhang, Y. He, & M. Liao, 2012d, Comparative proteomic analysis of a *Haemophilus parasuis* SC096 mutant deficient in the outer membrane protein P5: *Microb Pathog*, v. 52, p. 117-24.
- Zhang, J., C. Xu, L. Guo, H. Shen, X. Deng, C. Ke, B. Ke, B. Zhang, A. Li, T. Ren, & M. Liao, 2012e, Prevalence and characterization of genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from southern China: *Can J Vet Res*, v. 76, p. 224-9.
- Zhao, S., W. P. Fung-Leung, A. Bittner, K. Ngo, and X. Liu, 2014, Comparison of RNA-Seq & microarray in transcriptome profiling of activated T cells: *PLoS One*, v. 9, p. e78644.
- Zhao, Z., H. Liu, Y. Xue, K. Chen, Z. Liu, Q. Xue, & C. Wang, 2017, Analysis of efficacy obtained with a trivalent inactivated *Haemophilus parasuis* serovars 4, 5, and 12 vaccine and commercial vaccines against Glässer's disease in piglets, *Can J Vet Res*, v. 81, p. 22-7.
- Zhou, M., Y. Guo, J. Zhao, Q. Hu, Y. Hu, A. Zhang, H. Chen, & M. Jin, 2009a, Identification and characterization of novel immunogenic outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis* serovar 5: *Vaccine*, v. 27, p. 5271-7.

- Zhou, M., A. Zhang, Y. Guo, Y. Liao, H. Chen, & M. Jin, 2009b, A comprehensive proteome map of the *Haemophilus parasuis* serovar 5: *Proteomics*, v. 9, p. 2722-39.
- Zhou, M., Q. Zhang, J. Zhao, & M. Jin, 2012, *Haemophilus parasuis* encodes two functional cytolethal distending toxins: CdtC contains an atypical cholesterol recognition/interaction region: *PLoS One*, v. 7, p. e32580.
- Zhou, S. M., C. G. Xu, B. Zhang, S. X. Feng, L. Y. Zhang, Y. Zou, & M. Liao, 2013, Natural IgG antibodies in normal rabbit serum are involved in killing of the ompP2 mutant of *Haemophilus parasuis* SC096 strain via the classical complement pathway: *Vet J*, v. 196, p. 111-3.
- Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., A. Ramírez, K. J. Schwartz, & G. W. Stevenson. (2012). *Diseases of Swine*, 10^a ed. Oxford; Wiley-Blackwell.

8. ANEXOS

8.1. Tabla resumen de genes sobreexpresados en condiciones miméticas con $\log_2(\textit{fold change}) > 10$

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
HAPS_RS00115	plasmid stability protein StbD	-	-	NP	CP
HAPS_RS00120	RelE toxin	B8F327	stbE Putative plasmid stability protein StbE, addiction module antitoxin	NP	CP
HAPS_RS00325	GTP-binding protein	B8F366	typA GTP-binding protein/membrane GTPase involved in stress response	NP	CP
HAPS_RS00370	protein TolA	B8F375	tolA Cell envelope integrity inner membrane protein TolA	P	IM
HAPS_RS00425	sugar ABC transporter substrate-binding protein	B8F386	lptA Lipopolysaccharide export system protein LptA	NP	PP
HAPS_RS00480	pseudo	-	-	-	-
HAPS_RS00485	TonB-dependent receptor	-	-	P	OM
HAPS_RS00635	hypothetical protein	-	-	NP	CP
HAPS_RS00670	transposase	B8F3D0	HAPS_0133 Uncharacterized protein	NP	PP
HAPS_RS00730	acetolactate synthase	B8F3E1	ilvM Acetolactate synthase 2 regulatory subunit	NP	CP
HAPS_RS00735	hypothetical protein	-	-	P	OM
HAPS_RS00740*	autotransporter domain-containing protein*	-	-	P*	OM*
HAPS_RS00745*	hypothetical protein*	-	-	P*	EX*
HAPS_RS00825	hypothetical protein	-	-	NP	CP
HAPS_RS01010	transcription termination factor NusA	B8F3J4	nusA Transcription termination/antitermination protein NusA	NP	CP
HAPS_RS01015	translation initiation factor IF-2	B8F3J5	infB Translation initiation factor IF-2	NP	CP
HAPS_RS01040	LysR family transcriptional regulator	B8F3J8	HAPS_0207 Putative HTH-type transcriptional regulator	NP	CP
HAPS_RS01065	pseudo	-	-	-	-
HAPS_RS01070	tRNA s(4)U8 sulfurtransferase	B8F3K3	thiI tRNA sulfurtransferase	NP	CP
HAPS_RS01075	bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase/glucosamine-1-phosphate acetyltransferase	B8F3K4	glmU Bifunctional protein GlmU	NP	CP
HAPS_RS01255	ABC transporter permease	B8F3P0	HAPS_0253 ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport permease	P	IM
HAPS_RS01260	ABC transporter substrate-binding protein	B8F3P1	HAPS_0254 ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems periplasmic components protein	P	CP
HAPS_RS01265	ABC transporter ATP-binding protein	B8F3P2	HAPS_0255 ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, ATPase	P	IM
HAPS_RS01270	acyl-CoA dehydrogenase	B8F3P3	HAPS_0256 Acyl-CoA dehydrogenase	NP	CP
HAPS_RS01380	lysine tRNA synthetase	B8F3R5	lysS Lysine--tRNA ligase	NP	CP
HAPS_RS01385	peroxide stress protein YaaA	B8F3R6	HAPS_0280 UPF0246 protein HAPS_0280	NP	CP
HAPS_RS01395	elongation factor Ts	B8F3R8	tsf Elongation factor Ts	NP	CP
HAPS_RS01400	sulfurtransferase FdhD	-	-	P	CP
HAPS_RS01430	pseudo	-	-	-	-
HAPS_RS01435	hypothetical protein	B8F3S4	HAPS_0289 Uncharacterized protein	P	CP
HAPS_RS01560	tRNA 2-thiocytidine biosynthesis protein TtcA	-	-	NP	CP
HAPS_RS01750	hypothetical protein	-	-	NP	CP

Tabla 34: Resumen de genes sobreexpresados en condiciones miméticas con $\log_2(\text{fold change}) > 10$. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma). * indica que son la misma proteína.

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS01805</i>	ABC transporter ATPase	B8F3Z5	HAPS_0364 ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains-containing protein	P	PP
<i>HAPS_RS01810</i>	iron transporter	B8F3Z6	fieF Cation-efflux pump FieF, predicted Co/Zn/Cd cation transporter	NP	IM
<i>HAPS_RS01830</i>	hypothetical protein	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS01835</i>	hypothetical protein	B8F3Z9	HAPS_0370 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS01895</i>	hypothetical protein	B8F410	HAPS_0382 Uncharacterized protein	P	EX
<i>HAPS_RS01900</i>	esterase	B8F411	mhpC Putative esterase	NP	PP
<i>HAPS_RS02075</i>	pseudo	-	-	-	-
<i>HAPS_RS02080</i>	ATPase	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS02140</i>	transcriptional regulator	B8F450	HAPS_0433 Predicted transcription regulator containing HTH domain OS=Haemophilus parasuis serovar 5 (strain SH0165) GN=HAPS_0433 PE=4 SV=1	NP	CP
<i>HAPS_RS02145</i>	toxin RelE	B8F451	HAPS_0434 Putative membrane protein	NP	CP
<i>HAPS_RS02340</i>	RNA helicase	B8F490	deaD ATP-dependent RNA helicase DeaD	NP	CP
<i>HAPS_RS02480</i>	Nif3-like dinuclear metal center hexameric protein	B8F4B4	HAPS_0502 GTP cyclohydrolase 1 type 2 homolog	NP	CP
<i>HAPS_RS02610</i>	hypothetical protein	B8F4D5	purL Phosphoribosylformylglycinamide synthase	P	CP
<i>HAPS_RS02650</i>	hypothetical protein	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS02685</i>	molecular chaperone DnaK	B8F4E6	dnaK DnaK suppressor protein/ C4-type zinc finger protein, DksA/TraR family	NP	CP
<i>HAPS_RS02690</i>	bacteriophage P2 Tail completion protein GPR	B8F4E7	HAPS_0565 Putative bacteriophage protein, putative transcription regulator, cro/C1-type DNA-binding domain	NP	CP
<i>HAPS_RS02695</i>	virion morphogenesis protein	B8F4E8	gps Bacteriophage tail completion protein gpS-like protein/phage virion morphogenesis protein	NP	CP
<i>HAPS_RS02800</i>	transcriptional regulator	B8F4G7	HAPS_0565 Putative bacteriophage protein, putative transcription regulator	NP	CP
<i>HAPS_RS02830</i>	hypothetical protein	B8F4H6	HAPS_0575 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS02850</i>	translocation protein TolB precursor	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS02855</i>	single-stranded DNA-binding protein	B8F4I1	ssb Single-stranded DNA-binding protein	NP	PP
<i>HAPS_RS02955</i>	hypothetical protein	B8F4K1	HAPS_0600 Phage protein	NP	CP
<i>HAPS_RS03100</i>	hypothetical protein	B8F4N2	HAPS_0631 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS03150</i>	tRNA-Val	-	-	-	-
<i>HAPS_RS03180</i>	50S ribosomal protein L25	B8F4P6	rplY 50S ribosomal protein L25	NP	CP
<i>HAPS_RS03215</i>	potassium transporter	B8F4Q4	kefBC Glutathione-regulated potassium-efflux system protein	NP	IM
<i>HAPS_RS03450</i>	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	B8F4V1	murQ N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	NP	CP
<i>HAPS_RS03455</i>	anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	B8F4V2	HAPS_0708 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS03460</i>	tRNA pseudouridine(65) synthase TruC	B8F4V3	truC tRNA pseudouridine synthase C, pseudouridylate synthase, 23S RNA-specific	NP	CP
<i>HAPS_RS03710</i>	hypothetical protein	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS03735</i>	fimbrial usher protein	-	-	P	OM
<i>HAPS_RS03755</i>	predicted ATPase involved in chromosome partitioning	-	-	NP	CP

Tabla 34 (continuación): Resumen de genes sobreexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
HAPS_RS03770	hypothetical protein	B8F511	HAPS_0775 Putative prophage primase	NP	CP
HAPS_RS03820	tRNA-Leu	-	-	-	-
HAPS_RS04045	heat-shock protein	B8F560	hsIR Heat shock-like protein 15	NP	CP
HAPS_RS04050	redox-regulated molecular chaperone Hsp33	B8F561	hsIO 33 kDa chaperonin	NP	CP
HAPS_RS04055	DNA polymerase III subunit epsilon	B8F562	dnaQ DNA polymerase III subunit epsilon	NP	CP
HAPS_RS04100	peptide chain release factor 2	-	-	NP	CP
HAPS_RS04180	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	B8F586	mutM Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	NP	CP
HAPS_RS04480	hypothetical protein	-	-	P	PP
HAPS_RS04485	hypothetical protein	B8F5E9	HAPS_0923 Uncharacterized protein	P	EX
HAPS_RS04635	threonyl-tRNA synthetase	B8F5H9	thrS Threonine--tRNA ligase	NP	CP
HAPS_RS04900	transporter	B8F5M4	alsT Na+/alanine symporter	NP	IM
HAPS_RS05120	heme utilization protein HuvX	-	-	NP	CP
HAPS_RS05125	heme utilization protein HutZ	B8F5S2	hugZ Heme utilization protein	NP	CP
HAPS_RS05320	ribosome small subunit-dependent GTPase	-	-	NP	CP
HAPS_RS05350	pseudo	-	-	-	-
HAPS_RS05455	DNA-binding protein	B8F5Y2	hns DNA-binding protein	NP	CP
HAPS_RS05485	ABC transporter ATP-binding protein	-	-	NP	CP
HAPS_RS05580	antirepressor	B8F607	HAPS_1148 Possible prophage antirepressor	NP	CP
HAPS_RS05800	pseudo	-	-	-	-
HAPS_RS05955	arginyl-tRNA synthetase	-	-	NP	CP
HAPS_RS05960	pseudo	-	-	-	-
HAPS_RS06085	membrane protein	B8F693	accD Acetyl-CoA carboxylase beta subunit	NP	CP
HAPS_RS06380	glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C	B8F6F2	gIpC sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C	NP	CP
HAPS_RS06515	putrescine/spermidine ABC transporter substrate-binding protein	B8F6H2	potD Putrescine-binding periplasmic protein	NP	PP
HAPS_RS06520	hypothetical protein	B8F6H3	yaaH Permease, Inner membrane protein yaaH	P	IM
HAPS_RS06525	Holliday junction DNA helicase RuvA	-	-	NP	CP
HAPS_RS06610	cell envelope protein TonB	B8F6J2	tonB Protein TonB	P	PP
HAPS_RS06615	TonB system transport protein ExbD	B8F6J3	exbD TonB system transport protein ExbD type-2/biopolymer transport protein	NP	CP
HAPS_RS06635	tRNA-dihydrouridine synthase	B8F6J7	dusB tRNA-dihydrouridine synthase B	NP	CP
HAPS_RS06640	Fis family transcriptional regulator	B8F6J8	fis DNA-binding protein Fis	P	PP
HAPS_RS06835	4'-phosphopantetheinyl transferase	B8F6M9	yieE Phosphopantetheinyl transferase	NP	CP
HAPS_RS06865	hypothetical protein	B8F6N5	HAPS_1415 Uncharacterized protein	NP	CP
HAPS_RS06890	protease	B8F6P0	prtC Collagenase prtC/related protease involved in cellular process and signaling	NP	CP
HAPS_RS07435	MurR/RpiR family transcriptional regulator	B8F6Y4	rpiR RpiR family transcriptional regulator	NP	CP
HAPS_RS07625	heme ABC transporter ATP-binding protein	B8F722	hmuV Hemin transport system ATP-binding protein HmuV	NP	CP
HAPS_RS07630	iron ABC transporter permease	B8F723	hmuU Hemin transport system permease protein HmuU	P	IM

Tabla 34 (continuación): Resumen de genes sobreexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS07635</i>	hemin ABC transporter substrate-binding protein	-	-	NP	IM
<i>HAPS_RS07720</i>	RNA polymerase, beta subunit	B8F741	rpoB DNA-directed RNA polymerase subunit beta	NP	CP
<i>HAPS_RS07775</i>	30S ribosomal protein S10	B8F754	rpsJ 30S ribosomal protein S10	NP	CP
<i>HAPS_RS07780</i>	50S ribosomal protein L3	B8F755	rplC 50S ribosomal protein L3	NP	CP
<i>HAPS_RS07785</i>	50S ribosomal protein L4	B8F756	rplD 50S ribosomal protein L4	NP	CP
<i>HAPS_RS07790</i>	50S ribosomal protein L23	B8F757	rplW 50S ribosomal protein L23	NP	CP
<i>HAPS_RS07795</i>	50S ribosomal protein L2	B8F758	rplB 50S ribosomal protein L2	NP	CP
<i>HAPS_RS07950</i>	hypothetical protein	-	-	P	CP
<i>HAPS_RS07955</i>	membrane protein	B8F786	pykF Pyruvate kinase	NP	PP
<i>HAPS_RS08275</i>	endonuclease	B8F7D1	info Probable endonuclease 4	NP	CP
<i>HAPS_RS08315</i>	hypothetical protein	B8F7D5	HAPS_1712 Uncharacterized protein	NP	IM
<i>HAPS_RS08435</i>	addiction module protein	B8F7F5	hicA Addiction module killer protein	NP	CP
<i>HAPS_RS08440</i>	transcriptional regulator	B8F7F6	HAPS_1738 Possible transcriptional regulator	NP	CP
<i>HAPS_RS08560</i>	restriction endonuclease	B8F7H2	bcgIA Restriction enzyme, alpha subunit/N-6 DNA methylase	NP	CP
<i>HAPS_RS08565</i>	restriction endonuclease	B8F7H3	bcgIB Restriction enzyme, beta subunit/N-6 DNA methylase	NP	CP
<i>HAPS_RS08570</i>	restriction endonuclease	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS08685</i>	hypothetical protein	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS09000</i>	hypothetical protein	B8F7Q0	HAPS_1850 Uncharacterized protein	P	IM
<i>HAPS_RS09165</i>	molecular chaperone DnaJ	B8F7S3	dnaJ Chaperone protein DnaJ	NP	CP
<i>HAPS_RS09170</i>	virulence-associated protein VapD	B8F7S4	vapD Virulence-associated protein D	NP	CP
<i>HAPS_RS09385</i>	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	-	-	NP	PP
<i>HAPS_RS09560</i>	30S ribosomal protein S7	B8F7Z3	rpsG 30S ribosomal protein S7	NP	CP
<i>HAPS_RS09565</i>	elongation factor G	B8F7Z4	fusA Elongation factor G	NP	CP
<i>HAPS_RS09580</i>	23S rRNA (guanosine-2'-O-)-methyltransferase	B8F7Z6	rlmB 23S rRNA (guanosine-2'-O-)-methyltransferase RlmB	NP	CP
<i>HAPS_RS09625</i>	transposase	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS10065</i>	C4-dicarboxylate ABC transporter	B8F879	dcbB Anaerobic C4-dicarboxylate transporter	NP	IM
<i>HAPS_RS10195</i>	<i>DUF262 domain-containing protein</i>	B8F899	HAPS_2100 Uncharacterized protein	P	CP
<i>HAPS_RS10260</i>	dUMP phosphatase	B8F8A7	HAPS_2113 Nucleotidase/putative HAD superfamily haloacid dehalogenase-like hydrolase	NP	CP
<i>HAPS_RS10530</i>	ToIC family protein	B8F8F2	tolC RND efflux system outer membrane lipoprotein/RND superfamily resistance-nodulation-cell division antiporter	P	OM
<i>HAPS_RS10560</i>	transcriptional regulator	B8F8F7	HAPS_2174 XRE family transcriptional regulator	NP	CP
<i>HAPS_RS10565</i>	hypothetical protein	B8F8F8	HAPS_2175 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS10585</i>	ligand-gated channel	B8F8G2	hxC Heme/hemopexin utilization protein C/outer membrane receptor protein, mostly Fe transport	P	OM
<i>HAPS_RS10590</i>	ShlB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein	B8F8G3	hxB Heme/hemopexin-binding protein B, hemolysin activation/secretion protein	P	OM

Tabla 34 (continuación): Resumen de genes sobreexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS10595</i>	hypothetical protein	B8F8G4	hxA Heme/hemopexin-binding protein A (Heme:hemopexin utilization protein A)	P	EX
<i>HAPS_RS10730</i>	glycosyl transferase	B8F8I8	lsgE Putative lipooligosaccharide galactosyltransferase involved in cell wall biogenesis	NP	CP
<i>HAPS_RS10735</i>	amylovoran biosynthesis protein AmsE	B8F8I9	lsgF Putative UDP-galactose-- lipooligosaccharide galactosyltransferase	NP	CP
<i>HAPS_RS10765</i>	rod shape-determining protein MreC	-	-	NP	IM
<i>HAPS_RS10770</i>	rod shape-determining protein MreD	B8F8J7	mreD Rod shape-determining protein MreD	NP	IM
<i>HAPS_RS10775</i>	ATPase AAA	B8F8J8	rarA Recombination factor protein RarA	NP	CP
<i>HAPS_RS10780</i>	membrane protein	B8F8J9	HAPS_2219 Possible outer membrane protein/FOG: TPR repeat protein	P	OM
<i>HAPS_RS10785</i>	hypothetical protein	-	-	NP	PP
<i>HAPS_RS10790</i>	biopolymer transporter ExbB	B8F8K1	exbB Biopolymer transport ExbB protein	NP	IM
<i>HAPS_RS10795</i>	biopolymer transporter ExbD	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS10800</i>	transferrin-binding protein-like solute binding protein	-	-	P	OM
<i>HAPS_RS10805</i>	lactoferrin/transferrin family TonB-dependent receptor	B8F8K4	tbpA Transferrin-binding protein 1	P	OM
<i>HAPS_RS10825</i>	non-canonical purine NTP pyrophosphatase RdgB/HAM1 family	-	-	NP	CP
<i>HAPS_RS10830</i>	deoxyribonucleotide triphosphate pyrophosphatase	B8F8K9	HAPS_2229 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS10835</i>	YcgN family cysteine cluster protein	B8F8L0	HAPS_2230 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS10980</i>	flavodoxin	B8F8N8	fldA Flavodoxin	NP	CP
<i>HAPS_RS10985</i>	Fur family transcriptional regulator	B8F8N9	fur Ferric uptake regulation protein	NP	CP
<i>HAPS_RS11010</i>	transpeptidase	B8F8P5	HAPS_2267 Uncharacterized protein	P	PP
<i>HAPS_RS11030</i>	transcriptional regulator	B8F8P9	impA SOS-response transcriptional repressor	P	CP
<i>HAPS_RS11145</i>	pseudo	-	-	-	-
<i>HAPS_RS11150</i>	acyl-CoA esterase	B8F8S2	HAPS_2296 Uncharacterized protein	NP	CP

Tabla 34 (continuación): Resumen de genes sobreexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

8.2. Tabla resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con $\log_2(\textit{fold change}) > 10$

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS00025</i>	fumarate reductase flavoprotein subunit	B8F308	frdA Fumarate reductase flavoprotein subunit	NP	CP
<i>HAPS_RS00030</i>	succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-sulfur subunit	B8F309	frdB Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	NP	PP
<i>HAPS_RS00035</i>	fumarate reductase subunit C	B8F310	frdC Fumarate reductase subunit C	NP	IM
<i>HAPS_RS00040</i>	fumarate reductase subunit D	B8F311	frdD Fumarate reductase subunit D	NP	IM
<i>HAPS_RS00340</i>	cytochrome bd oxidase subunit I	B8F369	cydA Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit I	NP	IM
<i>HAPS_RS00345</i>	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	B8F370	cydB Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit II	NP	IM
<i>HAPS_RS00505</i>	fatty acid metabolism transcriptional regulator FadR	B8F398	fadR Fatty acid metabolism regulator protein	NP	CP
<i>HAPS_RS00775</i>	formate transporter FocA	B8F3E8	focA FNT family formate-nitrite transporter	NP	IM
<i>HAPS_RS00795</i>	transporter	B8F3F2	HAPS_0158 Putative transport protein HAPS_0158	NP	IM
<i>HAPS_RS00805</i>	dethiobiotin synthase	B8F3F4	bioD ATP-dependent dethiobiotin synthetase BioD	NP	CP
<i>HAPS_RS00810</i>	membrane protein	B8F3F5	HAPS_0161 Uncharacterized protein	NP	PP
<i>HAPS_RS00945</i>	tagatose-bisphosphate aldolase	B8F3I2	lacD Tagatose 1,6-diphosphate aldolase	NP	CP
<i>HAPS_RS00950</i>	PTS sugar transporter subunit IIA	B8F3I3	ptsEIIA PTS system, IIA component	NP	CP
<i>HAPS_RS00955</i>	beta-galactosidase	B8F3I4	bgaC Beta-galactosidase, glucosyl hydrolase family protein	NP	CP
<i>HAPS_RS00960</i>	PTS fructose transporter subunit IID	B8F3I5	ptsEIID PTS system, IID component	P	IM
<i>HAPS_RS00965</i>	PTS sugar transporter subunit IIC	B8F3I6	ptsEIIC PTS system, IIC component	P	IM
<i>HAPS_RS00970</i>	PTS mannose/fructose/sorbose transporter subunit IIB	B8F3I7	ptsEIIB PTS system, IIB component	NP	CP
<i>HAPS_RS00975</i>	tagatose-6-phosphate ketose isomerase	B8F3I8	agaS Tagatose-6-phosphate ketose/aldose isomerase	NP	CP
<i>HAPS_RS00980</i>	DeoR/GlpR transcriptional regulator	B8F3I9	agaR Transcriptional repressor AgaR/DNA-binding transcriptional dual regulator	NP	CP
<i>HAPS_RS01175</i>	maltose transporter permease	B8F3M4	malG ABC-type maltose transport systems, permease component	P	IM
<i>HAPS_RS01180</i>	maltose ABC transporter permease MalF	B8F3M5	malF ABC-type maltose transport systems, permease components	P	IM
<i>HAPS_RS01190</i>	ABC transporter ATP-binding protein	B8F3M7	malK Maltose/maltodextrin import ATP-binding protein MalK	NP	CP
<i>HAPS_RS01320</i>	tRNA-dihydrouridine synthase A			P	CP
<i>HAPS_RS01325</i>	pseudo				
<i>HAPS_RS01410</i>	sulfate ABC transporter substrate-binding protein	B8F3S0	fdxG_2 Transcriptional formate dehydrogenase alpha major subunit/formate dehydrogenase, nitrate-inducible, major subunit	NP	PP

Tabla 35: Resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con $\log_2(\text{fold change}) > 10$. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS01415</i>	formate dehydrogenase-N subunit alpha	B8F3S1	fdxG_1 Transcriptional formate dehydrogenase alpha major subunit/formate dehydrogenase, nitrate-inducible, major subunit	NP	PP
<i>HAPS_RS01420</i>	formate dehydrogenase subunit beta	B8F3S2	fdxH Formate dehydrogenase iron-sulfur subunit, beta subunit/Fe-S-cluster-containing hydrogenase components 1	NP	CP
<i>HAPS_RS01425</i>	formate dehydrogenase subunit gamma	B8F3S3	fdxI Formate dehydrogenase cytochrome B556 subunit, gamma subunit	NP	IM
<i>HAPS_RS01440</i>	glycogen-branching enzyme	B8F3S5	glgB 1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB	NP	CP
<i>HAPS_RS01445</i>	glycogen debranching enzyme	B8F3S6	glgX Glycogen operon protein GlgX	NP	CP
<i>HAPS_RS01450</i>	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	B8F3S7	glgC Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	NP	CP
<i>HAPS_RS01780</i>	cold shock domain protein CspD	B8F3Z0	cspD Cold shock-like protein CspD	NP	CP
<i>HAPS_RS01970</i>	hypothetical protein		HAPS_0398 UPF0265 protein HAPS_0398	NP	CP
<i>HAPS_RS02010</i>	N-acetylneuraminate lyase	B8F434	nanA N-acetylneuraminate lyase	NP	CP
<i>HAPS_RS02015</i>	MurR/RpiR family transcriptional regulator	B8F435	HAPS_0407 Putative HTH-type transcriptional regulator	NP	CP
<i>HAPS_RS02020</i>	YhcH/YjgK/YiaL family protein	B8F436	HAPS_0408 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS02180</i>	galactose ABC transporter substrate-binding protein	B8F459	mglB Galactose ABC transporter periplasmic-binding protein/LacI transcriptional regulator	NP	PP
<i>HAPS_RS02185</i>	galactose/methyl galactoside ABC transporter ATP-binding protein MglA	B8F460	mglA Galactose/methyl galactoside import ATP-binding protein MglA	NP	CP
<i>HAPS_RS02190</i>	galactoside ABC transporter permease MglC	B8F461	mglC Galactose ABC transporter inner membrane component	NP	IM
<i>HAPS_RS02290</i>	carbon storage regulator	B8F480	csrA Carbon storage regulator homolog	NP	CP
<i>HAPS_RS02300</i>	universal stress protein A			NP	CP
<i>HAPS_RS02505</i>	MarC family protein	B8F4B7	marC UPF0056 inner membrane protein	P	IM
<i>HAPS_RS02860</i>	hypothetical protein	B8F4I2	HAPS_0581 Hypothetical phage protein	NP	CP
<i>HAPS_RS02875</i>	hypothetical protein	B8F4I5	HAPS_0584 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS02885</i>	hypothetical protein			NP	CP
<i>HAPS_RS02890</i>	phage tail protein/putative Fels-1 prophage host specificity protein	B8F4I8	HAPS_0587 Phage tail protein/putative Fels-1 prophage host specificity protein	P	OM
<i>HAPS_RS02905</i>	tail assembly protein	B8F4J1	HAPS_0590 Bacteriophage lambda tail assembly I	P	PP
<i>HAPS_RS02960</i>	hypothetical protein	B8F4K2	HAPS_0601 Phage protein	P	EX
<i>HAPS_RS02975</i>	phage tail protein	B8F4K5	HAPS_0604 Possible bacteriophage tail protein	NP	CP

Tabla 35 (continuación): Resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
HAPS_RS02980	hypothetical protein	B8F4K6	HAPS_0605 Putative RecA/RadA recombinase	NP	CP
HAPS_RS02985	peptidase S14	B8F4K7	HAPS_0606 ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	NP	PP
HAPS_RS02990	phage portal protein	B8F4K8	HAPS_0607 Bacteriophage capsid protein	NP	CP
HAPS_RS02995	hypothetical protein	B8F4K9	HAPS_0608 Hypothetical prophage protein	NP	CP
HAPS_RS03175	ribosome-binding factor A	B8F4P5	HAPS_0648 Putative serine protease	P	EX
HAPS_RS03195	2-oxoglutarate dehydrogenase subunit E1	B8F4P9	kgd Alpha-ketoglutarate decarboxylase	NP	CP
HAPS_RS03200	dihydroliipoamide succinyltransferase	B8F4Q1	sucB Dihydroliipoalyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	NP	CP
HAPS_RS03205	succinyl-CoA ligase subunit beta	B8F4Q2	sucC Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	NP	CP
HAPS_RS03210	succinate--CoA ligase subunit alpha	B8F4Q3	sucD Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	NP	CP
HAPS_RS03310	lactate utilization protein C	B8F4S4	HAPS_0678 Putative conserved iron-sulfur protein	NP	CP
HAPS_RS03315	iron-sulfur cluster-binding protein	B8F4S5	HAPS_0679 Iron-sulfur cluster binding reductase	NP	CP
HAPS_RS03320	hypothetical protein	B8F4S6	HAPS_0680 Fe-S oxidoreductase	NP	CP
HAPS_RS03325	lactate permease	B8F4S7	lctP L-lactate permease	NP	IM
HAPS_RS03495	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology	B8F4W1	pckA Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	NP	CP
HAPS_RS03660	DNA starvation/stationary phase protection protein	B8F4Z3	dps Ferritin and DNA-binding stress protein	P	CP
HAPS_RS03685	superoxide dismutase	B8F4Z8	sodC Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P	PP
HAPS_RS04120	transporter	B8F573	comEA DNA uptake protein	P	CP
HAPS_RS04145	phosphomannomutase	B8F578	manB Phosphomannomutase	NP	PP
HAPS_RS04150	rRNA methyltransferase	B8F579	ftsJ rRNA methyltransferase	NP	CP
HAPS_RS04170	beta-ketoacyl-ACP reductase	B8F583	fabG 3-ketoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase	NP	CP
HAPS_RS04655	PTS glucose transporter subunit IIA	B8F5I2	crr Glucose-specific PTS system component	NP	CP
HAPS_RS04660	phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase	B8F5I3	ptsI Phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase	NP	CP
HAPS_RS04665	HPr family phosphocarrier protein	B8F5I4	ptsH Phosphotransferase system, phosphocarrier protein HPr	NP	CP
HAPS_RS04705	preprotein translocase subunit YajC	B8F5J1	yajC Preprotein translocase subunit YajC	NP	CP
HAPS_RS04720	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	B8F5J4	gpmA 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	NP	CP
HAPS_RS04740	transketolase	B8F5J8	tktA Transketolase	NP	CP
HAPS_RS04770	malate dehydrogenase	B8F5K4	mdh Malate dehydrogenase	NP	CP

Tabla 35 (continuación): Resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
HAPS_RS04820	hypothetical protein	B8F5K9	HAPS_0991 Uncharacterized protein	NP	CP
HAPS_RS04825	5S ribosomal RNA				
HAPS_RS04845	ABC transporter substrate-binding protein	B8F5L3	oppA Oligopeptide permease ABC transporter membrane protein	P	PP
HAPS_RS04905	PTS sucrose transporter subunit IIBC	B8F5M5	ptsB PTS system sucrose-specific EIIBC component	NP	IM
HAPS_RS05085	peptidylprolyl isomerase	B8F5R4	slyD Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	NP	CP
HAPS_RS05160	arginine transporter permease subunit ArtM	B8F5S9	artM Arginine transporter permease subunit ArtM	P	IM
HAPS_RS05165	arginine transporter permease subunit ArtQ			P	IM
HAPS_RS05170	arginine ABC transporter substrate-binding protein	B8F5T1	artI ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain	NP	PP
HAPS_RS05175	arginine ABC transporter ATP-binding protein ArtP	B8F5T2	artP ABC-type arginine transport system, ATPase component	NP	CP
HAPS_RS05280	ammonia-forming cytochrome c nitrite reductase subunit c552	B8F5V4	nrfA Cytochrome c-552	NP	PP
HAPS_RS05285	cytochrome c nitrite reductase pentaheme subunit	B8F5V5	nrfB Cytochrome c-type protein NrfB	NP	PP
HAPS_RS05290	cytochrome c nitrite reductase Fe-S protein	B8F5V6	nrfC Nitrate reductase	NP	PP
HAPS_RS05295	cytochrome c nitrite reductase subunit NrfD	B8F5V7	nrfD Nitrate reductase, transmembrane protein	NP	IM
HAPS_RS05325	metal ABC transporter substrate-binding protein	B8F5W2	yfeA Chelated iron ABC transporter, periplasmic-binding protein	P	PP
HAPS_RS05385	aspartate ammonia-lyase	B8F5X1	aspA Aspartate ammonia-lyase	NP	CP
HAPS_RS05500	cytochrome-c peroxidase	B8F5Z1	ccp Cytochrome c peroxidase	NP	PP
HAPS_RS05665	cell division protein ZapA	B8F622	zapA Cell division protein ZapA	NP	CP
HAPS_RS05790	tellurite resistance methyltransferase TehB	B8F643	tehB Tellurite resistance protein TehB	NP	CP
HAPS_RS05835	fructose-bisphosphatase class I	B8F651	fbp Fructose-1,6-bisphosphatase class I	NP	CP
HAPS_RS05895	GTPase HflX	B8F664	hflX GTPase HflX	NP	CP
HAPS_RS05905	N-acetylmannosamine kinase	B8F666	nanK N-acetylmannosamine kinase	NP	CP
HAPS_RS05910	N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	B8F667	nanE Putative N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	NP	CP
HAPS_RS05970	tRNA-Gly				
HAPS_RS05975	tRNA-Tyr				
HAPS_RS05980	tRNA-Thr				
HAPS_RS06050	tRNA-Leu				
HAPS_RS06460	tRNA-His				
HAPS_RS06465	tRNA-Pro				
HAPS_RS06500	bifunctional proline dehydrogenase/L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	B8F6G8	putA Bifunctional protein PutA	NP	CP
HAPS_RS06680	serine protease	B8F6K6	espP1 Putative extracellular serine protease (Autotransporter)	P	EX

Tabla 35 (continuación): Resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
HAPS_RS06850	phosphopantetheine adenyltransferase	B8F6N2	coaD Phosphopantetheine adenyltransferase	NP	CP
HAPS_RS07095	tRNA-Leu				
HAPS_RS07160	serine peptidase	B8F6T4	htrA Periplasmic serine protease do/hhoA-like	NP	PP
HAPS_RS07290	anaerobic C4-dicarboxylate transporter			P	IM
HAPS_RS07415	L-fucose isomerase	B8F6Y0	fucI L-fucose isomerase	NP	CP
HAPS_RS07420	L-fuculokinase	B8F6Y1	fucK L-fuculokinase	NP	OM
HAPS_RS07425	L-fucose mutarotase	B8F6Y2	fucU L-fucose mutarotase	NP	CP
HAPS_RS07440	5-dehydro-2-deoxygluconokinase	B8F6Y5	iolC Myoinositol catabolism protein, sugar kinase	NP	CP
HAPS_RS07445	3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione acylhydrolase (decyclizing)	B8F6Y6	iolD Myoinositol catabolism protein, acetolactate synthase	NP	CP
HAPS_RS07450	myo-inosose-2 dehydratase	B8F6Y7	iolE Inosose dehydratase	NP	CP
HAPS_RS07460	PTS fructose transporter subunit IIC	B8F6Y9	celB Permease IIC component	NP	IM
HAPS_RS07465	alpha-L-fucosidase	B8F6Z0	alfA Alpha-L-fucosidase	NP	CP
HAPS_RS07470	gfo/ldh/MocA family oxidoreductase	B8F6Z1	HAPS_1537 Dehydrogenase	NP	CP
HAPS_RS07475	ABC transporter permease			P	IM
HAPS_RS07480	sugar ABC transporter ATP-binding protein	B8F6Z3	yphE Fused predicted sugar transporter subunits of ABC superfamily: ATP-binding components	NP	CP
HAPS_RS07485	ATPase	B8F6Z4	yphF Predicted sugar transporter subunit: periplasmic-binding component of ABC superfamily	NP	CP
HAPS_RS07490	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (CoA acylating)	B8F6Z5	HAPS_1541 Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	NP	CP
HAPS_RS07640	DNA processing protein DprA	B8F725	smf Smf protein, Rossmann fold nucleotide-binding protein involved in DNA uptake	NP	CP
HAPS_RS07765	class II fumarate hydratase	B8F751	fumC Fumarate hydratase class II	NP	PP
HAPS_RS07830	sialidase			P	OM
HAPS_RS07850	F0F1 ATP synthase subunit I	B8F767	atpI F0F1 ATP synthase subunit I/H(+)-transporting two-sector ATPase, F(0) subunit I	NP	IM
HAPS_RS07890	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	B8F775	atpC ATP synthase epsilon chain	NP	CP
HAPS_RS07900	D-ribose pyranase	B8F777	rbsD D-ribose pyranase	NP	CP
HAPS_RS07905	ribose ABC transporter ATP-binding protein RbsA	B8F778	rbsA1 Ribose import ATP-binding protein RbsA	NP	CP
HAPS_RS07910	ribose ABC transporter permease	B8F779	rbsC1 ABC D-ribose transporter permease protein RbsC	NP	IM
HAPS_RS07915	D-ribose ABC transporter substrate-binding protein	B8F780	rbsB1 ABC D-ribose transporter periplasmic-binding component RbsB	NP	PP
HAPS_RS07920	ribokinase	B8F781	rbsK1 Ribokinase	NP	CP

Tabla 35 (continuación): Resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
HAPS_RS08025	paraslipin	B8F796	hflC SPFH domain-containing protein	NP	IM
HAPS_RS08030	NfeD family protein	B8F797	HAPS_1654 Regulator of membrane protease activity	NP	IM
HAPS_RS08355	hypothetical protein	B8F7E0	HAPS_1720 Uncharacterized protein	NP	PP
HAPS_RS08380	LacI family transcriptional regulator	B8F7E3	rbsB2 ABC D-ribose transporter periplasmic-binding component RbsB	NP	PP
HAPS_RS08385	ABC transporter permease	B8F7E4	rbsC2 ABC D-ribose transporter permease protein RbsC	P	IM
HAPS_RS08405	PTS mannose transporter subunit IID	B8F7E8	manZ PTS system mannose-specific protein IID	P	IM
HAPS_RS08410	PTS mannose/fructose/sorbose transporter subunit IIC	B8F7E9	manY PTS system mannose/fructose/sorbose family IIC subunit	P	IM
HAPS_RS08415	PTS mannose transporter subunit EIIAB	B8F7F0	manX PTS system mannose-specific EIIAB component	NP	CP
HAPS_RS08450	ATP-dependent protease	B8F7F8	comM Competence protein M	P	CP
HAPS_RS08485	triose-phosphate isomerase	B8F7G2	tpiA Triosephosphate isomerase	NP	CP
HAPS_RS08625	hypothetical protein	B8F7I4	HAPS_1774 Uncharacterized protein	P	PP
HAPS_RS08630	hypothetical protein			NP	CP
HAPS_RS08660	PTS ascorbate transporter subunit IIA	B8F7I8	ulaC Ascorbate-specific phosphotransferase protein IIA component, Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA domain (Ntr-type)	NP	CP
HAPS_RS08665	PTS ascorbate transporter subunit IIBC	B8F7I9	ulaA Ascorbate-specific PTS system enzyme IIC/IIB	NP	IM
HAPS_RS08705	hypothetical protein	B8F7J4	mazG Nucleotide pyrophosphohydrolase	NP	CP
HAPS_RS08725	cytochrome c	B8F7J8	napC Cytochrome c-type protein	NP	PP
HAPS_RS08730	nitrate reductase cytochrome C550 subunit	B8F7J9	napB Periplasmic nitrate reductase, electron transfer subunit	NP	PP
HAPS_RS08735	quinol dehydrogenase ferredoxin subunit NapH	B8F7K0	napH Quinol dehydrogenase membrane component, NapH/MauN family ferredoxin-type protein	NP	IM
HAPS_RS08740	ferredoxin-type protein NapG			NP	PP
HAPS_RS08745	periplasmic nitrate reductase subunit alpha	B8F7K2	napA Periplasmic nitrate reductase	NP	PP
HAPS_RS08750	reductase	B8F7K3	napD Periplasmic nitrate reductase subunit NapD	P	CP
HAPS_RS08755	ferredoxin-type protein NapF			NP	CP
HAPS_RS08760	50S ribosomal protein L36	B8F7K6	rpmJ1 50S ribosomal protein L36	NP	CP
HAPS_RS08765	50S ribosomal protein L31 type B	B8F7K7	rpmE2 50S ribosomal protein L31 type B	NP	CP
HAPS_RS08770	ribulose-phosphate 3-epimerase	B8F7K8	rpe Ribulose-phosphate 3-epimerase	NP	CP
HAPS_RS08775	arylsulfatase	B8F7K9	HAPS_1801 Arylsulfatase A	NP	CP

Tabla 35 (continuación): Resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

<i>Locus</i>	Producto Genbank	n° Uniprot	Nombre Uniprot	Patogenia	Localización
<i>HAPS_RS08780</i>	solute:sodium symporter family transporter	B8F7L0	yidK SSS family solute:sodium (Na+) symporter	NP	IM
<i>HAPS_RS08825</i>	lactate dehydrogenase	B8F7L9	HAPS_1811 Malate/L-lactate dehydrogenase	NP	CP
<i>HAPS_RS08830</i>	hypothetical protein			NP	CP
<i>HAPS_RS08970</i>	metalloprotease TldD	B8F7P5	tldD Protease involved in Microcin B17 maturation and in sensitivity to the DNA gyrase inhibitor LetD	NP	CP
<i>HAPS_RS09005</i>	pseudo				
<i>HAPS_RS09185</i>	pseudo				
<i>HAPS_RS09225</i>	C4-dicarboxylate ABC transporter substrate-binding protein	B8F7T5	HAPS_1899 TRAP transporter solute receptor TAXI family protein	P	PP
<i>HAPS_RS09230</i>	C4-dicarboxylate ABC transporter	B8F7T6	dctM TRAP C4-dicarboxylate transport system permease DctM subunit	P	IM
<i>HAPS_RS09235</i>	universal stress protein	B8F7T7	uspA Universal stress protein A	NP	CP
<i>HAPS_RS09295</i>	alanine dehydrogenase	B8F7U9	ald Alanine dehydrogenase	NP	CP
<i>HAPS_RS09300</i>	sodium-dependent transporter	B8F7V0	HAPS_1914 Transporter	NP	IM
<i>HAPS_RS09530</i>	uridine phosphorylase	B8F7Y9	udp Uridine phosphorylase	NP	CP
<i>HAPS_RS09535</i>	DUF413 family protein	B8F7Z0	HAPS_1962 Uncharacterized protein	NP	CP
<i>HAPS_RS09610</i>	acid phosphatase/phosphotransferase	B8F802	napA Class B acid phosphatase	NP	PP
<i>HAPS_RS09770</i>	prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein	B8F829	pilA Tfp pilus assembly protein, major pilin PilA	P	EX
<i>HAPS_RS09940</i>	DNA repair protein RadC			NP	CP
<i>HAPS_RS10105</i>	pseudo				
<i>HAPS_RS10345</i>	transporter	B8F8C4	HAPS_2130 Di-and tricarboxylate transporter	NP	IM
<i>HAPS_RS10570</i>	bifunctional malic enzyme oxidoreductase/phosphotransacetylase	B8F8F9	sfcA Malic enzyme	NP	CP
<i>HAPS_RS10920</i>	beta-D-galactosidase			NP	EX
<i>HAPS_RS11050</i>	isocitrate dehydrogenase (NADP(+))	B8F8Q3	icd Isocitrate dehydrogenase [NADP]	NP	CP
<i>HAPS_RS11055</i>	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology	B8F8Q4	acnB Aconitate hydratase B	NP	CP
<i>HAPS_RS11060</i>	citrate (Si)-synthase	B8F8Q5	gltA Citrate synthase	NP	CP
<i>HAPS_RS11095</i>	hypothetical protein	B8F8R2	comA Competence protein A	NP	CP
<i>HAPS_RS11100</i>	hypothetical protein	B8F8R3	HAPS_2286 Uncharacterized protein	P	PP
<i>HAPS_RS11105</i>	hypothetical protein	B8F8R4	HAPS_2287 Chromosome segregation ATPase	P	EX
<i>HAPS_RS11110</i>	hypothetical protein	B8F8R5	HAPS_2288 Uncharacterized protein	P	PP
<i>HAPS_RS11115</i>	secretin	B8F8R6	comE Competence protein E/type II secretory pathway, component HofQ	P	OM

Tabla 35 (continuación): Resumen de genes subexpresados en condiciones miméticas con \log_2 (*fold change*) > 10. En caso de tratarse de proteínas se indica si están relacionadas con la patogenia (P) o no (NP) y su localización (EX para extracelular, OM para membrana interna, PP para periplasma, IM para membrana interna y CP para citoplasma).

8.3. Log_2 (*fold change*) de todos los genes sobreexpresados en condiciones miméticas

<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)								
HAPS_RS10595	537,265	HAPS_RS07635	256,738	HAPS_RS06865	165,667	HAPS_RS10560	142,244	HAPS_RS02340	125,467
HAPS_RS10585	499,925	HAPS_RS07625	256,738	HAPS_RS00740	160,702	HAPS_RS01435	142,135	HAPS_RS02695	125,291
HAPS_RS10785	486,213	HAPS_RS06635	254,832	HAPS_RS00745	160,702	HAPS_RS05320	141,044	HAPS_RS03770	124,788
HAPS_RS10790	486,213	HAPS_RS00485	244,095	HAPS_RS09565	158,667	HAPS_RS10765	140,235	HAPS_RS03820	124,222
HAPS_RS10795	486,213	HAPS_RS11145	240,743	HAPS_RS01805	158,247	HAPS_RS10770	140,235	HAPS_RS09385	124,221
HAPS_RS10800	486,213	HAPS_RS01265	237,259	HAPS_RS01810	158,247	HAPS_RS10775	140,235	HAPS_RS09560	122,872
HAPS_RS10805	486,213	HAPS_RS00480	232,685	HAPS_RS04640	158,193	HAPS_RS09165	138,816	HAPS_RS04480	122,727
HAPS_RS10780	364,695	HAPS_RS09170	219,664	HAPS_RS07435	157,892	HAPS_RS01385	137,763	HAPS_RS04485	122,727
HAPS_RS02685	362,878	HAPS_RS09625	204,575	HAPS_RS00670	157,631	HAPS_RS01255	136,792	HAPS_RS07790	122,282
HAPS_RS02690	362,878	HAPS_RS02480	203,183	HAPS_RS01010	157,147	HAPS_RS02075	132,785	HAPS_RS07785	122,282
HAPS_RS04045	357,377	HAPS_RS02140	190,625	HAPS_RS10825	155,318	HAPS_RS01400	132,583	HAPS_RS05350	121,934
HAPS_RS04055	357,377	HAPS_RS00635	189,744	HAPS_RS02955	152,102	HAPS_RS01895	129,815	HAPS_RS10730	121,849
HAPS_RS04050	357,377	HAPS_RS02145	179,027	HAPS_RS05955	151,879	HAPS_RS01075	129,333	HAPS_RS10735	121,849
HAPS_RS05960	349,821	HAPS_RS02650	178,311	HAPS_RS04100	149,344	HAPS_RS05485	129,306	HAPS_RS00370	121,313
HAPS_RS05125	318,148	HAPS_RS10985	177,887	HAPS_RS01830	147,905	HAPS_RS06520	128,309	HAPS_RS03735	121,148
HAPS_RS10565	292,683	HAPS_RS04900	177,797	HAPS_RS01835	147,905	HAPS_RS02080	128,075	HAPS_RS00425	120,846
HAPS_RS01270	291,299	HAPS_RS11150	177,388	HAPS_RS01560	146,965	HAPS_RS04635	127,713	HAPS_RS01900	120,009
HAPS_RS02800	286,453	HAPS_RS05580	177,315	HAPS_RS11285	145,112	HAPS_RS03150	127,519	HAPS_RS01380	118,293
HAPS_RS06640	284,738	HAPS_RS03755	176,785	HAPS_RS03455	144,624	HAPS_RS00325	126,669	HAPS_RS03450	117,852
HAPS_RS08685	280,374	HAPS_RS01430	176,555	HAPS_RS03460	144,624	HAPS_RS07950	126,454	HAPS_RS06610	117,039
HAPS_RS04900	278,315	HAPS_RS08435	174,448	HAPS_RS01750	143,515	HAPS_RS07955	126,454	HAPS_RS06615	117,039
HAPS_RS05800	271,337	HAPS_RS03215	168,501	HAPS_RS08275	143,097	HAPS_RS06515	126,119	HAPS_RS00115	116,962
HAPS_RS07630	256,738	HAPS_RS01260	168,423	HAPS_RS06525	143,014	HAPS_RS07720	125,889	HAPS_RS00120	116,962

Tabla 36: Todos los genes sobreexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (*fold Change*).

<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)								
<i>HAPS_RS02830</i>	116,339	<i>HAPS_RS11010</i>	104,282	<i>HAPS_RS09425</i>	0,99319	<i>HAPS_RS00435</i>	0,932363	<i>HAPS_RS07805</i>	0,856648
<i>HAPS_RS08560</i>	116,056	<i>HAPS_RS10530</i>	104,173	<i>HAPS_RS09430</i>	0,99319	<i>HAPS_RS00440</i>	0,932363	<i>HAPS_RS03445</i>	0,854797
<i>HAPS_RS08565</i>	116,056	<i>HAPS_RS10830</i>	104,117	<i>HAPS_RS02655</i>	0,990948	<i>HAPS_RS04175</i>	0,932198	<i>HAPS_RS10815</i>	0,851191
<i>HAPS_RS08570</i>	116,056	<i>HAPS_RS10835</i>	104,117	<i>HAPS_RS00075</i>	0,988214	<i>HAPS_RS06265</i>	0,931116	<i>HAPS_RS10820</i>	0,851191
<i>HAPS_RS08440</i>	115,652	<i>HAPS_RS10260</i>	102,987	<i>HAPS_RS11075</i>	0,987319	<i>HAPS_RS03850</i>	0,929084	<i>HAPS_RS10405</i>	0,844556
<i>HAPS_RS00730</i>	114,846	<i>HAPS_RS01395</i>	102,453	<i>HAPS_RS10160</i>	0,985086	<i>HAPS_RS03855</i>	0,929084	<i>HAPS_RS07810</i>	0,843869
<i>HAPS_RS00735</i>	113,592	<i>HAPS_RS03710</i>	101,264	<i>HAPS_RS02170</i>	0,983372	<i>HAPS_RS00170</i>	0,926734	<i>HAPS_RS02105</i>	0,843366
<i>HAPS_RS11030</i>	113,443	<i>HAPS_RS10065</i>	100,864	<i>HAPS_RS02175</i>	0,983372	<i>HAPS_RS00300</i>	0,923982	<i>HAPS_RS09670</i>	0,843151
<i>HAPS_RS04180</i>	112,072	<i>HAPS_RS01040</i>	100,309	<i>HAPS_RS00125</i>	0,982464	<i>HAPS_RS00305</i>	0,923982	<i>HAPS_RS03730</i>	0,839448
<i>HAPS_RS09580</i>	110,622	<i>HAPS_RS10590</i>	58,433	<i>HAPS_RS02345</i>	0,981234	<i>HAPS_RS06565</i>	0,923252	<i>HAPS_RS06240</i>	0,837389
<i>HAPS_RS07795</i>	110,597	<i>HAPS_RS05120</i>	35,233	<i>HAPS_RS07800</i>	0,979893	<i>HAPS_RS03725</i>	0,91637	<i>HAPS_RS10175</i>	0,837302
<i>HAPS_RS08315</i>	110,381	<i>HAPS_RS01015</i>	23,843	<i>HAPS_RS01165</i>	0,976972	<i>HAPS_RS00050</i>	0,902367	<i>HAPS_RS10180</i>	0,837302
<i>HAPS_RS02850</i>	109,682	<i>HAPS_RS03100</i>	17,823	<i>HAPS_RS11070</i>	0,976795	<i>HAPS_RS00055</i>	0,902367	<i>HAPS_RS10035</i>	0,836986
<i>HAPS_RS02855</i>	109,682	<i>HAPS_RS01070</i>	16,524	<i>HAPS_RS06260</i>	0,975375	<i>HAPS_RS00705</i>	0,899507	<i>HAPS_RS09555</i>	0,83679
<i>HAPS_RS07780</i>	109,653	<i>HAPS_RS06085</i>	14,425	<i>HAPS_RS00845</i>	0,973012	<i>HAPS_RS07115</i>	0,893939	<i>HAPS_RS06370</i>	0,834602
<i>HAPS_RS09000</i>	109,453	<i>HAPS_RS01065</i>	14,316	<i>HAPS_RS10255</i>	0,965944	<i>HAPS_RS02165</i>	0,889761	<i>HAPS_RS01800</i>	0,831736
<i>HAPS_RS10195</i>	108,039	<i>HAPS_RS00825</i>	12,812	<i>HAPS_RS00080</i>	0,965415	<i>HAPS_RS00770</i>	0,888288	<i>HAPS_RS08250</i>	0,830617
<i>HAPS_RS05455</i>	107,482	<i>HAPS_RS03180</i>	12,295	<i>HAPS_RS10990</i>	0,962122	<i>HAPS_RS03030</i>	0,885951	<i>HAPS_RS01245</i>	0,829147
<i>HAPS_RS10980</i>	106,657	<i>HAPS_RS06835</i>	12,203	<i>HAPS_RS06290</i>	0,945744	<i>HAPS_RS00330</i>	0,880982	<i>HAPS_RS01250</i>	0,829147
<i>HAPS_RS02610</i>	105,994	<i>HAPS_RS06890</i>	11,946	<i>HAPS_RS06295</i>	0,945744	<i>HAPS_RS00280</i>	0,870923	<i>HAPS_RS05450</i>	0,827774
<i>HAPS_RS07775</i>	105,993	<i>HAPS_RS04140</i>	1,178	<i>HAPS_RS03185</i>	0,945724	<i>HAPS_RS08305</i>	0,868429	<i>HAPS_RS07725</i>	0,826597
<i>HAPS_RS02570</i>	105,552	<i>HAPS_RS10265</i>	0,999269	<i>HAPS_RS00175</i>	0,93987	<i>HAPS_RS02560</i>	0,861788	<i>HAPS_RS09780</i>	0,820966
<i>HAPS_RS06380</i>	105,267	<i>HAPS_RS00925</i>	0,996963	<i>HAPS_RS00180</i>	0,93987	<i>HAPS_RS10870</i>	0,858851	<i>HAPS_RS08260</i>	0,819673

Tabla 36 (continuación): Todos los genes sobreexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (*fold Change*).

<i>Locus</i>	\log_2 (fold change)								
HAPS_RS02160	0,819297	HAPS_RS11260	0,76914	HAPS_RS00900	0,707926	HAPS_RS00365	0,679225	HAPS_RS03520	0,627969
HAPS_RS03155	0,81795	HAPS_RS06185	0,760672	HAPS_RS00420	0,706498	HAPS_RS06870	0,671501	HAPS_RS07500	0,625423
HAPS_RS04270	0,816286	HAPS_RS01550	0,760213	HAPS_RS03860	0,702451	HAPS_RS10340	0,671277	HAPS_RS07945	0,622694
HAPS_RS04275	0,816286	HAPS_RS01725	0,755627	HAPS_RS03915	0,700418	HAPS_RS07505	0,663535	HAPS_RS06005	0,622258
HAPS_RS06620	0,812073	HAPS_RS11185	0,755627	HAPS_RS03920	0,700418	HAPS_RS02705	0,66026	HAPS_RS04105	0,620615
HAPS_RS06385	0,810707	HAPS_RS09585	0,754152	HAPS_RS10900	0,698923	HAPS_RS08510	0,656072	HAPS_RS01145	0,619378
HAPS_RS06390	0,810707	HAPS_RS05490	0,752148	HAPS_RS10905	0,698923	HAPS_RS02615	0,653418	HAPS_RS06540	0,617949
HAPS_RS11080	0,807628	HAPS_RS05025	0,74499	HAPS_RS10910	0,698923	HAPS_RS03160	0,652909	HAPS_RS02475	0,615773
HAPS_RS10375	0,807422	HAPS_RS04020	0,742928	HAPS_RS10915	0,698923	HAPS_RS07135	0,651222	HAPS_RS10200	0,61549
HAPS_RS02620	0,801821	HAPS_RS04025	0,742928	HAPS_RS06530	0,698381	HAPS_RS09460	0,647854	HAPS_RS06830	0,613365
HAPS_RS00295	0,800717	HAPS_RS10705	0,738233	HAPS_RS02730	0,695407	HAPS_RS02865	0,645969	HAPS_RS03840	0,610936
HAPS_RS00475	0,79501	HAPS_RS01275	0,736587	HAPS_RS02555	0,692317	HAPS_RS02870	0,645969	HAPS_RS03845	0,610936
HAPS_RS06250	0,794302	HAPS_RS01280	0,736587	HAPS_RS10455	0,692234	HAPS_RS11025	0,645773	HAPS_RS07715	0,610544
HAPS_RS04475	0,793998	HAPS_RS08840	0,736188	HAPS_RS04650	0,690329	HAPS_RS09370	0,639002	HAPS_RS05465	0,606476
HAPS_RS01625	0,790624	HAPS_RS01115	0,732755	HAPS_RS00290	0,689293	HAPS_RS03555	0,637033	HAPS_RS05470	0,606476
HAPS_RS06180	0,790461	HAPS_RS01850	0,723358	HAPS_RS00905	0,686474	HAPS_RS01955	0,635947	HAPS_RS05475	0,606476
HAPS_RS00430	0,789327	HAPS_RS10320	0,718598	HAPS_RS07140	0,685469	HAPS_RS03425	0,633724	HAPS_RS05480	0,606476
HAPS_RS10325	0,78876	HAPS_RS08190	0,717808	HAPS_RS01155	0,684683	HAPS_RS03430	0,633724	HAPS_RS02370	0,601008
HAPS_RS05775	0,782755	HAPS_RS04395	0,717526	HAPS_RS01160	0,684683	HAPS_RS06585	0,63262	HAPS_RS06075	0,593959
HAPS_RS05780	0,782755	HAPS_RS04400	0,717526	HAPS_RS03655	0,683681	HAPS_RS00835	0,632186	HAPS_RS06080	0,593959
HAPS_RS05060	0,778354	HAPS_RS04405	0,717526	HAPS_RS02350	0,68324	HAPS_RS00105	0,630552	HAPS_RS00680	0,59029
HAPS_RS06550	0,778051	HAPS_RS01240	0,715515	HAPS_RS03250	0,682716	HAPS_RS09695	0,629673	HAPS_RS10450	0,589914
HAPS_RS06065	0,773563	HAPS_RS10630	0,714688	HAPS_RS09630	0,681133	HAPS_RS06000	0,628422	HAPS_RS03690	0,58938

Tabla 36 (continuación): Todos los genes sobreexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (fold Change).

<i>Locus</i>	\log_2 (fold change)								
<i>HAPS_RS03695</i>	0,58938	<i>HAPS_RS07515</i>	0,558591	<i>HAPS_RS02550</i>	0,511399	<i>HAPS_RS03765</i>	0,471097	<i>HAPS_RS04685</i>	0,423749
<i>HAPS_RS03665</i>	0,588812	<i>HAPS_RS10420</i>	0,557725	<i>HAPS_RS03570</i>	0,509507	<i>HAPS_RS04580</i>	0,46967	<i>HAPS_RS03830</i>	0,423181
<i>HAPS_RS05670</i>	0,587183	<i>HAPS_RS00725</i>	0,555361	<i>HAPS_RS00895</i>	0,505932	<i>HAPS_RS01820</i>	0,465013	<i>HAPS_RS00875</i>	0,421251
<i>HAPS_RS10330</i>	0,586799	<i>HAPS_RS06065</i>	0,549158	<i>HAPS_RS00880</i>	0,502053	<i>HAPS_RS09635</i>	0,464203	<i>HAPS_RS10085</i>	0,419019
<i>HAPS_RS05810</i>	0,586623	<i>HAPS_RS00110</i>	0,548115	<i>HAPS_RS05530</i>	0,501754	<i>HAPS_RS04570</i>	0,456839	<i>HAPS_RS00655</i>	0,413584
<i>HAPS_RS04985</i>	0,58401	<i>HAPS_RS06285</i>	0,546801	<i>HAPS_RS07315</i>	0,500926	<i>HAPS_RS04135</i>	0,448977	<i>HAPS_RS06120</i>	0,406228
<i>HAPS_RS05805</i>	0,583154	<i>HAPS_RS09245</i>	0,543988	<i>HAPS_RS00395</i>	0,499173	<i>HAPS_RS06170</i>	0,448198	<i>HAPS_RS10080</i>	0,405818
<i>HAPS_RS01390</i>	0,58028	<i>HAPS_RS09700</i>	0,541437	<i>HAPS_RS00400</i>	0,499173	<i>HAPS_RS00935</i>	0,447073	<i>HAPS_RS07355</i>	0,401681
<i>HAPS_RS10600</i>	0,578266	<i>HAPS_RS06200</i>	0,539113	<i>HAPS_RS02225</i>	0,496039	<i>HAPS_RS06715</i>	0,446444		
<i>HAPS_RS02390</i>	0,576949	<i>HAPS_RS06175</i>	0,537893	<i>HAPS_RS08425</i>	0,495161	<i>HAPS_RS06720</i>	0,446444		
<i>HAPS_RS01675</i>	0,57648	<i>HAPS_RS03590</i>	0,527221	<i>HAPS_RS00710</i>	0,490929	<i>HAPS_RS06725</i>	0,446444		
<i>HAPS_RS10830</i>	0,575318	<i>HAPS_RS05395</i>	0,526995	<i>HAPS_RS07020</i>	0,488318	<i>HAPS_RS06205</i>	0,440738		
<i>HAPS_RS06010</i>	0,573553	<i>HAPS_RS00275</i>	0,525589	<i>HAPS_RS08690</i>	0,486632	<i>HAPS_RS10550</i>	0,43946		
<i>HAPS_RS02740</i>	0,572439	<i>HAPS_RS09140</i>	0,525307	<i>HAPS_RS09790</i>	0,486162	<i>HAPS_RS08310</i>	0,436526		
<i>HAPS_RS04585</i>	0,571327	<i>HAPS_RS00335</i>	0,522378	<i>HAPS_RS11085</i>	0,476664	<i>HAPS_RS05410</i>	0,434776		
<i>HAPS_RS02510</i>	0,57017	<i>HAPS_RS07670</i>	0,516988	<i>HAPS_RS06395</i>	0,474758	<i>HAPS_RS05415</i>	0,434776		
<i>HAPS_RS09620</i>	0,567041	<i>HAPS_RS10460</i>	0,516779	<i>HAPS_RS03080</i>	0,474144	<i>HAPS_RS00790</i>	0,433521		
<i>HAPS_RS02155</i>	0,566072	<i>HAPS_RS09715</i>	0,514049	<i>HAPS_RS09745</i>	0,471918	<i>HAPS_RS05795</i>	0,433078		
<i>HAPS_RS04945</i>	0,559144	<i>HAPS_RS06895</i>	0,513094	<i>HAPS_RS07170</i>	0,471726	<i>HAPS_RS09835</i>	0,423963		
<i>HAPS_RS07510</i>	0,558591	<i>HAPS_RS07350</i>	0,512956	<i>HAPS_RS03760</i>	0,471097	<i>HAPS_RS00915</i>	0,423806		

Tabla 36 (continuación): Todos los genes sobreexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (fold Change).

8.4. Log_2 (*fold change*) de todos los genes subexpresados en condiciones miméticas

<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)								
<i>HAPS_RS09770</i>	-506,005	<i>HAPS_RS11100</i>	-261,719	<i>HAPS_RS03325</i>	-214,698	<i>HAPS_RS08770</i>	-180,073	<i>HAPS_RS03195</i>	-155,266
<i>HAPS_RS04120</i>	-471,441	<i>HAPS_RS11105</i>	-261,719	<i>HAPS_RS04145</i>	-210,188	<i>HAPS_RS09185</i>	-176,634	<i>HAPS_RS01410</i>	-154,275
<i>HAPS_RS00975</i>	-451,964	<i>HAPS_RS11110</i>	-261,719	<i>HAPS_RS07915</i>	-207,892	<i>HAPS_RS07465</i>	-176,083	<i>HAPS_RS05980</i>	-152,532
<i>HAPS_RS05280</i>	-446,162	<i>HAPS_RS09300</i>	-255,897	<i>HAPS_RS07420</i>	-203,781	<i>HAPS_RS09940</i>	-175,406	<i>HAPS_RS07425</i>	-152,299
<i>HAPS_RS08750</i>	-445,828	<i>HAPS_RS11055</i>	-250,946	<i>HAPS_RS07290</i>	-203,445	<i>HAPS_RS01320</i>	-171,849	<i>HAPS_RS11050</i>	-151,494
<i>HAPS_RS08755</i>	-414,595	<i>HAPS_RS05385</i>	-246,386	<i>HAPS_RS03320</i>	-202,945	<i>HAPS_RS08405</i>	-168,467	<i>HAPS_RS03210</i>	-150,312
<i>HAPS_RS00980</i>	-414,584	<i>HAPS_RS07415</i>	-246,362	<i>HAPS_RS01420</i>	-202,865	<i>HAPS_RS04720</i>	-167,485	<i>HAPS_RS03205</i>	-150,312
<i>HAPS_RS00955</i>	-397,918	<i>HAPS_RS07765</i>	-244,647	<i>HAPS_RS01425</i>	-202,865	<i>HAPS_RS08825</i>	-167,009	<i>HAPS_RS05910</i>	-149,951
<i>HAPS_RS08745</i>	-393,066	<i>HAPS_RS04770</i>	-238,565	<i>HAPS_RS09225</i>	-201,572	<i>HAPS_RS08830</i>	-167,009	<i>HAPS_RS06050</i>	-149,896
<i>HAPS_RS00960</i>	-381,032	<i>HAPS_RS08725</i>	-238,098	<i>HAPS_RS03315</i>	-199,219	<i>HAPS_RS07920</i>	-165,813	<i>HAPS_RS04665</i>	-149,284
<i>HAPS_RS00965</i>	-381,032	<i>HAPS_RS08730</i>	-238,098	<i>HAPS_RS02190</i>	-194,789	<i>HAPS_RS01415</i>	-165,293	<i>HAPS_RS07445</i>	-146,095
<i>HAPS_RS05165</i>	-361,476	<i>HAPS_RS08740</i>	-238,098	<i>HAPS_RS05790</i>	-193,746	<i>HAPS_RS10570</i>	-164,987	<i>HAPS_RS08665</i>	-145,107
<i>HAPS_RS05170</i>	-361,476	<i>HAPS_RS08735</i>	-238,098	<i>HAPS_RS09535</i>	-190,365	<i>HAPS_RS02985</i>	-164,704	<i>HAPS_RS06680</i>	-142,608
<i>HAPS_RS05175</i>	-361,476	<i>HAPS_RS03685</i>	-235,752	<i>HAPS_RS05285</i>	-190,304	<i>HAPS_RS09295</i>	-164,563	<i>HAPS_RS00775</i>	-141,373
<i>HAPS_RS05160</i>	-361,476	<i>HAPS_RS07830</i>	-234,222	<i>HAPS_RS05290</i>	-190,304	<i>HAPS_RS06465</i>	-164,464	<i>HAPS_RS08450</i>	-140,698
<i>HAPS_RS02180</i>	-349,685	<i>HAPS_RS07910</i>	-234,001	<i>HAPS_RS05295</i>	-190,304	<i>HAPS_RS02010</i>	-163,659	<i>HAPS_RS07450</i>	-140,594
<i>HAPS_RS11060</i>	-341,552	<i>HAPS_RS03310</i>	-228,773	<i>HAPS_RS08415</i>	-189,798	<i>HAPS_RS10105</i>	-162,728	<i>HAPS_RS07890</i>	-140,517
<i>HAPS_RS03495</i>	-315,081	<i>HAPS_RS09530</i>	-226,396	<i>HAPS_RS04820</i>	-187,455	<i>HAPS_RS08775</i>	-162,344	<i>HAPS_RS07480</i>	-138,759
<i>HAPS_RS00950</i>	-298,209	<i>HAPS_RS00945</i>	-224,571	<i>HAPS_RS05975</i>	-185,808	<i>HAPS_RS09005</i>	-161,878	<i>HAPS_RS05970</i>	-138,493
<i>HAPS_RS07485</i>	-266,176	<i>HAPS_RS10345</i>	-219,686	<i>HAPS_RS08410</i>	-185,496	<i>HAPS_RS07905</i>	-158,755	<i>HAPS_RS02860</i>	-138,297
<i>HAPS_RS05500</i>	-264,473	<i>HAPS_RS08765</i>	-217,842	<i>HAPS_RS05835</i>	-182,886	<i>HAPS_RS00505</i>	-158,734	<i>HAPS_RS00345</i>	-135,174
<i>HAPS_RS02300</i>	-262,141	<i>HAPS_RS08760</i>	-217,842	<i>HAPS_RS07475</i>	-181,941	<i>HAPS_RS02875</i>	-157,459	<i>HAPS_RS02990</i>	-133,578
<i>HAPS_RS11095</i>	-261,719	<i>HAPS_RS02185</i>	-217,638	<i>HAPS_RS01445</i>	-181,383	<i>HAPS_RS00340</i>	-156,353	<i>HAPS_RS07460</i>	-133,009

Tabla 37: Todos los genes subexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (*fold Change*).

<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)								
<i>HAPS_RS03200</i>	-132,429	<i>HAPS_RS02015</i>	-114,601	<i>HAPS_RS05895</i>	-102,182	<i>HAPS_RS07640</i>	-11,296	<i>HAPS_RS03680</i>	-0,930005
<i>HAPS_RS07490</i>	-131,279	<i>HAPS_RS08485</i>	-113,604	<i>HAPS_RS02020</i>	-102,174	<i>HAPS_RS02885</i>	-10,992	<i>HAPS_RS10935</i>	-0,929819
<i>HAPS_RS08030</i>	-130,963	<i>HAPS_RS07900</i>	-113,008	<i>HAPS_RS05905</i>	-101,976	<i>HAPS_RS02890</i>	-10,992	<i>HAPS_RS00780</i>	-0,928401
<i>HAPS_RS06850</i>	-130,646	<i>HAPS_RS02290</i>	-112,997	<i>HAPS_RS08705</i>	-101,658	<i>HAPS_RS07860</i>	-1,06	<i>HAPS_RS02370</i>	-0,924647
<i>HAPS_RS01780</i>	-129,407	<i>HAPS_RS05325</i>	-111,955	<i>HAPS_RS09230</i>	-100,869	<i>HAPS_RS04575</i>	-0,992814	<i>HAPS_RS07880</i>	-0,922298
<i>HAPS_RS07095</i>	-129,291	<i>HAPS_RS08385</i>	-111,323	<i>HAPS_RS09235</i>	-100,869	<i>HAPS_RS07735</i>	-0,992264	<i>HAPS_RS09180</i>	-0,917879
<i>HAPS_RS01325</i>	-129,191	<i>HAPS_RS06460</i>	-110,497	<i>HAPS_RS06500</i>	-100,326	<i>HAPS_RS08700</i>	-0,990104	<i>HAPS_RS00495</i>	-0,916738
<i>HAPS_RS05665</i>	-127,583	<i>HAPS_RS07160</i>	-110,151	<i>HAPS_RS04705</i>	-100,245	<i>HAPS_RS07930</i>	-0,988759	<i>HAPS_RS02965</i>	-0,910891
<i>HAPS_RS10920</i>	-127,432	<i>HAPS_RS04660</i>	-109,206	<i>HAPS_RS00970</i>	-44,153	<i>HAPS_RS07870</i>	-0,987777	<i>HAPS_RS02970</i>	-0,910891
<i>HAPS_RS07470</i>	-126,696	<i>HAPS_RS01190</i>	-108,853	<i>HAPS_RS00025</i>	-34,862	<i>HAPS_RS00005</i>	-0,986381	<i>HAPS_RS05915</i>	-0,908304
<i>HAPS_RS08355</i>	-123,371	<i>HAPS_RS05085</i>	-108,189	<i>HAPS_RS00030</i>	-34,862	<i>HAPS_RS07865</i>	-0,985115	<i>HAPS_RS05920</i>	-0,908304
<i>HAPS_RS07850</i>	-122,819	<i>HAPS_RS02905</i>	-107,938	<i>HAPS_RS00035</i>	-34,862	<i>HAPS_RS06220</i>	-0,983455	<i>HAPS_RS07885</i>	-0,906299
<i>HAPS_RS02975</i>	-121,607	<i>HAPS_RS08625</i>	-107,305	<i>HAPS_RS00040</i>	-34,862	<i>HAPS_RS06225</i>	-0,983455	<i>HAPS_RS07320</i>	-0,906142
<i>HAPS_RS02980</i>	-121,607	<i>HAPS_RS04845</i>	-106,817	<i>HAPS_RS04825</i>	-27,014	<i>HAPS_RS07740</i>	-0,978398	<i>HAPS_RS07845</i>	-0,905923
<i>HAPS_RS01970</i>	-120,267	<i>HAPS_RS04905</i>	-106,273	<i>HAPS_RS11115</i>	-24,779	<i>HAPS_RS04875</i>	-0,974803	<i>HAPS_RS05090</i>	-0,900957
<i>HAPS_RS00810</i>	-119,976	<i>HAPS_RS07440</i>	-105,707	<i>HAPS_RS04170</i>	-23,015	<i>HAPS_RS08370</i>	-0,963106	<i>HAPS_RS01700</i>	-0,89425
<i>HAPS_RS03660</i>	-119,631	<i>HAPS_RS04150</i>	-105,138	<i>HAPS_RS01440</i>	-21,291	<i>HAPS_RS03880</i>	-0,957901	<i>HAPS_RS03970</i>	-0,890126
<i>HAPS_RS08630</i>	-119,224	<i>HAPS_RS02995</i>	-105,121	<i>HAPS_RS00795</i>	-19,696	<i>HAPS_RS03505</i>	-0,953701	<i>HAPS_RS03965</i>	-0,890126
<i>HAPS_RS01450</i>	-118,539	<i>HAPS_RS02505</i>	-105,009	<i>HAPS_RS08780</i>	-17,232	<i>HAPS_RS10225</i>	-0,943581	<i>HAPS_RS01770</i>	-0,883472
<i>HAPS_RS08025</i>	-117,388	<i>HAPS_RS03175</i>	-103,765	<i>HAPS_RS09610</i>	-15,122	<i>HAPS_RS09465</i>	-0,93698	<i>HAPS_RS03950</i>	-0,882151
<i>HAPS_RS08380</i>	-115,165	<i>HAPS_RS00805</i>	-103,595	<i>HAPS_RS08660</i>	-12,178	<i>HAPS_RS05930</i>	-0,932391	<i>HAPS_RS06150</i>	-0,870871
<i>HAPS_RS01175</i>	-115,044	<i>HAPS_RS08970</i>	-103,067	<i>HAPS_RS04740</i>	-12,055	<i>HAPS_RS05935</i>	-0,932391	<i>HAPS_RS10355</i>	-0,866567
<i>HAPS_RS04655</i>	-114,997	<i>HAPS_RS02960</i>	-102,727	<i>HAPS_RS01180</i>	-11,687	<i>HAPS_RS05940</i>	-0,932391	<i>HAPS_RS05080</i>	-0,8628

Tabla 37 (continuación): Todos los genes subexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (*fold Change*).

<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)								
<i>HAPS_RS06430</i>	-0,858137	<i>HAPS_RS04810</i>	-0,814242	<i>HAPS_RS05240</i>	-0,753211	<i>HAPS_RS08195</i>	-0,687439	<i>HAPS_RS01705</i>	-0,653415
<i>HAPS_RS11265</i>	-0,858137	<i>HAPS_RS07875</i>	-0,811751	<i>HAPS_RS05245</i>	-0,753211	<i>HAPS_RS08515</i>	-0,685065	<i>HAPS_RS01710</i>	-0,653415
<i>HAPS_RS06405</i>	-0,857568	<i>HAPS_RS06735</i>	-0,810301	<i>HAPS_RS05250</i>	-0,753211	<i>HAPS_RS11310</i>	-0,685065	<i>HAPS_RS01460</i>	-0,652219
<i>HAPS_RS03865</i>	-0,85324	<i>HAPS_RS09200</i>	-0,809346	<i>HAPS_RS05255</i>	-0,753211	<i>HAPS_RS07530</i>	-0,684734	<i>HAPS_RS10755</i>	-0,652005
<i>HAPS_RS10955</i>	-0,850684	<i>HAPS_RS03260</i>	-0,80755	<i>HAPS_RS05260</i>	-0,753211	<i>HAPS_RS07535</i>	-0,684734	<i>HAPS_RS08835</i>	-0,647122
<i>HAPS_RS05050</i>	-0,848958	<i>HAPS_RS04850</i>	-0,806477	<i>HAPS_RS05265</i>	-0,753211	<i>HAPS_RS02280</i>	-0,673855	<i>HAPS_RS05860</i>	-0,643464
<i>HAPS_RS02285</i>	-0,848407	<i>HAPS_RS09275</i>	-0,797915	<i>HAPS_RS05270</i>	-0,753211	<i>HAPS_RS05035</i>	-0,672594	<i>HAPS_RS05820</i>	-0,639863
<i>HAPS_RS08055</i>	-0,847242	<i>HAPS_RS05365</i>	-0,791403	<i>HAPS_RS00320</i>	-0,752004	<i>HAPS_RS05330</i>	-0,671779	<i>HAPS_RS07080</i>	-0,639128
<i>HAPS_RS04830</i>	-0,846311	<i>HAPS_RS05620</i>	-0,790985	<i>HAPS_RS06145</i>	-0,737178	<i>HAPS_RS07245</i>	-0,671282	<i>HAPS_RS00165</i>	-0,638825
<i>HAPS_RS10895</i>	-0,844063	<i>HAPS_RS11165</i>	-0,787972	<i>HAPS_RS07265</i>	-0,734784	<i>HAPS_RS09690</i>	-0,670777	<i>HAPS_RS08230</i>	-0,638598
<i>HAPS_RS07855</i>	-0,841698	<i>HAPS_RS04910</i>	-0,785888	<i>HAPS_RS03510</i>	-0,731833	<i>HAPS_RS07975</i>	-0,670326	<i>HAPS_RS00380</i>	-0,636571
<i>HAPS_RS06495</i>	-0,839445	<i>HAPS_RS08820</i>	-0,782854	<i>HAPS_RS09195</i>	-0,726059	<i>HAPS_RS01170</i>	-0,670267	<i>HAPS_RS05040</i>	-0,635336
<i>HAPS_RS07645</i>	-0,835904	<i>HAPS_RS11320</i>	-0,77894	<i>HAPS_RS01760</i>	-0,723866	<i>HAPS_RS04870</i>	-0,667468	<i>HAPS_RS02600</i>	-0,628758
<i>HAPS_RS11280</i>	-0,835904	<i>HAPS_RS10055</i>	-0,774977	<i>HAPS_RS07200</i>	-0,72364	<i>HAPS_RS05075</i>	-0,665334	<i>HAPS_RS06425</i>	-0,628195
<i>HAPS_RS07650</i>	-0,835904	<i>HAPS_RS07410</i>	-0,769055	<i>HAPS_RS08805</i>	-0,721529	<i>HAPS_RS00700</i>	-0,663349	<i>HAPS_RS08430</i>	-0,627535
<i>HAPS_RS04835</i>	-0,828288	<i>HAPS_RS01775</i>	-0,768086	<i>HAPS_RS02365</i>	-0,707949	<i>HAPS_RS09845</i>	-0,662606	<i>HAPS_RS07380</i>	-0,627508
<i>HAPS_RS01100</i>	-0,827943	<i>HAPS_RS02625</i>	-0,767473	<i>HAPS_RS07295</i>	-0,705736	<i>HAPS_RS03465</i>	-0,661519	<i>HAPS_RS05445</i>	-0,622105
<i>HAPS_RS00350</i>	-0,823208	<i>HAPS_RS06130</i>	-0,767425	<i>HAPS_RS01360</i>	-0,702214	<i>HAPS_RS09550</i>	-0,660637	<i>HAPS_RS10060</i>	-0,621476
<i>HAPS_RS00210</i>	-0,82233	<i>HAPS_RS06855</i>	-0,765319	<i>HAPS_RS07745</i>	-0,701324	<i>HAPS_RS07190</i>	-0,65809	<i>HAPS_RS08525</i>	-0,621431
<i>HAPS_RS00215</i>	-0,82233	<i>HAPS_RS10350</i>	-0,762344	<i>HAPS_RS06025</i>	-0,694259	<i>HAPS_RS08815</i>	-0,657772	<i>HAPS_RS08050</i>	-0,607998
<i>HAPS_RS09355</i>	-0,820089	<i>HAPS_RS08810</i>	-0,761866	<i>HAPS_RS06030</i>	-0,694259	<i>HAPS_RS02125</i>	-0,655519	<i>HAPS_RS03140</i>	-0,60779
<i>HAPS_RS07770</i>	-0,81508	<i>HAPS_RS10810</i>	-0,753486	<i>HAPS_RS04855</i>	-0,693139	<i>HAPS_RS02130</i>	-0,655519	<i>HAPS_RS00910</i>	-0,607098

Tabla 37 (continuación): Todos los genes subexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (*fold Change*).

<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)	<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)	<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)	<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)	<i>Locus</i>	\log_2 (<i>fold change</i>)
<i>HAPS_RS10050</i>	-0,600537	<i>HAPS_RS10950</i>	-0,564626	<i>HAPS_RS10965</i>	-0,543173	<i>HAPS_RS06605</i>	-0,503233	<i>HAPS_RS01715</i>	-0,452143
<i>HAPS_RS05890</i>	-0,599748	<i>HAPS_RS03355</i>	-0,563866	<i>HAPS_RS02930</i>	-0,542719	<i>HAPS_RS01455</i>	-0,501462	<i>HAPS_RS10415</i>	-0,448549
<i>HAPS_RS04515</i>	-0,598479	<i>HAPS_RS06040</i>	-0,563019	<i>HAPS_RS07520</i>	-0,538045	<i>HAPS_RS04670</i>	-0,500936	<i>HAPS_RS06315</i>	-0,446713
<i>HAPS_RS05360</i>	-0,595974	<i>HAPS_RS05840</i>	-0,562821	<i>HAPS_RS10750</i>	-0,537363	<i>HAPS_RS03440</i>	-0,499275	<i>HAPS_RS00755</i>	-0,446696
<i>HAPS_RS00240</i>	-0,594225	<i>HAPS_RS08460</i>	-0,561463	<i>HAPS_RS04155</i>	-0,536647	<i>HAPS_RS02215</i>	-0,499144	<i>HAPS_RS06740</i>	-0,446346
<i>HAPS_RS10505</i>	-0,593008	<i>HAPS_RS08465</i>	-0,561463	<i>HAPS_RS11140</i>	-0,531134	<i>HAPS_RS06095</i>	-0,497344	<i>HAPS_RS09975</i>	-0,441037
<i>HAPS_RS10510</i>	-0,593008	<i>HAPS_RS04095</i>	-0,55996	<i>HAPS_RS04915</i>	-0,530124	<i>HAPS_RS05660</i>	-0,49696	<i>HAPS_RS05310</i>	-0,440021
<i>HAPS_RS07405</i>	-0,590034	<i>HAPS_RS01575</i>	-0,558175	<i>HAPS_RS07430</i>	-0,527954	<i>HAPS_RS02530</i>	-0,488499	<i>HAPS_RS09730</i>	-0,436429
<i>HAPS_RS09910</i>	-0,589802	<i>HAPS_RS03500</i>	-0,555377	<i>HAPS_RS05510</i>	-0,523356	<i>HAPS_RS00690</i>	-0,488231	<i>HAPS_RS07365</i>	-0,435154
<i>HAPS_RS06790</i>	-0,586523	<i>HAPS_RS08595,</i>	-0,553028	<i>HAPS_RS01765</i>	-0,522764	<i>HAPS_RS05405</i>	-0,48726	<i>HAPS_RS07455</i>	-0,434818
<i>HAPS_RS01475</i>	-0,586163	<i>HAPS_RS08600</i>	-0,553028	<i>HAPS_RS04505</i>	-0,521905	<i>HAPS_RS02360</i>	-0,481143	<i>HAPS_RS09650</i>	-0,433624
<i>HAPS_RS07010</i>	-0,584348	<i>HAPS_RS06690</i>	-0,551438	<i>HAPS_RS05070</i>	-0,52182	<i>HAPS_RS01285</i>	-0,480186	<i>HAPS_RS09655</i>	-0,433624
<i>HAPS_RS03360</i>	-0,583447	<i>HAPS_RS07120</i>	-0,545822	<i>HAPS_RS05020</i>	-0,520976	<i>HAPS_RS05030</i>	-0,480087	<i>HAPS_RS09660</i>	-0,433624
<i>HAPS_RS06320</i>	-0,578423	<i>HAPS_RS02295</i>	-0,545757	<i>HAPS_RS09720</i>	-0,518365	<i>HAPS_RS05095</i>	-0,479918	<i>HAPS_RS05900</i>	-0,429685
<i>HAPS_RS06415</i>	-0,577352	<i>HAPS_RS09710</i>	-0,545069	<i>HAPS_RS01105</i>	-0,512683	<i>HAPS_RS03405</i>	-0,47948	<i>HAPS_RS11275</i>	-0,42687
<i>HAPS_RS04250</i>	-0,576248	<i>HAPS_RS01935</i>	-0,545012	<i>HAPS_RS07360</i>	-0,512214	<i>HAPS_RS08225</i>	-0,479094	<i>HAPS_RS08065</i>	-0,424188
<i>HAPS_RS00890</i>	-0,575417	<i>HAPS_RS05210</i>	-0,544994	<i>HAPS_RS03105</i>	-0,511588	<i>HAPS_RS08375</i>	-0,473252	<i>HAPS_RS08070</i>	-0,424188
<i>HAPS_RS06340</i>	-0,574281	<i>HAPS_RS05215</i>	-0,544994	<i>HAPS_RS05375</i>	-0,510473	<i>HAPS_RS08390</i>	-0,466083	<i>HAPS_RS03815</i>	-0,4183
<i>HAPS_RS01130</i>	-0,573955	<i>HAPS_RS05220</i>	-0,544994	<i>HAPS_RS01740</i>	-0,510457	<i>HAPS_RS02275</i>	-0,463142	<i>HAPS_RS06210</i>	-0,416268
<i>HAPS_RS01685</i>	-0,567395	<i>HAPS_RS04800</i>	-0,544262	<i>HAPS_RS06140</i>	-0,510451	<i>HAPS_RS05305</i>	-0,461644	<i>HAPS_RS06035</i>	-0,414171
<i>HAPS_RS03330</i>	-0,565698	<i>HAPS_RS01185</i>	-0,543931	<i>HAPS_RS03035</i>	-0,507466	<i>HAPS_RS00550</i>	-0,460752	<i>HAPS_RS01655</i>	-0,402258
<i>HAPS_RS10940</i>	-0,564626	<i>HAPS_RS03365</i>	-0,54327	<i>HAPS_RS10970</i>	-0,506269	<i>HAPS_RS02645</i>	-0,45379	<i>HAPS_RS05990</i>	-0,3936

Tabla 37 (continuación): Todos los genes subexpresados en condiciones miméticas y su \log_2 (*fold Change*).

**8.5. Genes sobreexpresados clasificados dentro del término
GO:0003676 (unión a ácidos nucleicos)**

LOCUS	PRODUCTO GENBANK	n° UNIPROT	Nombre UNIPROT
HAPS_RS06635	tRNA-dihydrouridine synthase	B8F6J7	dusB tRNA-dihydrouridine synthase B
HAPS_RS07775	30S ribosomal protein S10	B8F754	rpsJ 30S ribosomal protein S10
HAPS_RS01040	LysR family transcriptional regulator	B8F3J8	HAPS_0207 Putative HTH-type transcriptional regulator
HAPS_RS03460	tRNA pseudouridine(65) synthase TruC	B8F4V3	truC tRNA pseudouridine synthase C, pseudouridylate synthase, 23S RNA-specific
HAPS_RS07435	MurR/RpiR family transcriptional regulator	B8F6Y4	rpiR RpiR family transcriptional regulator
HAPS_RS02800	transcriptional regulator	B8F4G7	Putative bacteriophage protein, putative transcription regulator
HAPS_RS02140	transcriptional regulator	B8F450	Predicted transcription regulator containing HTH domain OS=Haemophilus parasuis serovar 5 (strain SH0165) GN=HAPS_0433 PE=4 SV=1
HAPS_RS09580	23S rRNA (guanosine-2'-O-)-methyltransferase	B8F7Z6	rlmB 23S rRNA (guanosine-2'-O-)-methyltransferase RlmB
HAPS_RS08560	restriction endonuclease	B8F7H2	bcgIA Restriction enzyme, alpha subunit/N-6 DNA methylase
HAPS_RS09560	30S ribosomal protein S7	B8F7Z3	rpsG 30S ribosomal protein S7
HAPS_RS09565	elongation factor G	B8F7Z4	fusA Elongation factor G
HAPS_RS08275	endonuclease	B8F7D1	info Probable endonuclease 4
HAPS_RS10985	Fur family transcriptional regulator	B8F8N9	fur Ferric uptake regulation protein
HAPS_RS02340	RNA helicase	B8F490	deaD ATP-dependent RNA helicase DeaD
HAPS_RS04055	DNA polymerase III subunit epsilon	B8F562	dnaQ DNA polymerase III subunit epsilon
HAPS_RS01380	lysine tRNA synthetase	B8F3R5	lysS Lysine--tRNA ligase
HAPS_RS08565	restriction endonuclease	B8F7H3	bcgIB Restriction enzyme, beta subunit/N-6 DNA methylase
HAPS_RS08440	transcriptional regulator	B8F7F6	HAPS_1738 Possible transcriptional regulator
HAPS_RS05455	DNA-binding protein	B8F5Y2	hns DNA-binding protein
HAPS_RS06640	Fis family transcriptional regulator	B8F6J8	fis DNA-binding protein Fis
HAPS_RS07795	50S ribosomal protein L2	B8F758	rplB 50S ribosomal protein L2
HAPS_RS07785	50S ribosomal protein L4	B8F756	rplD 50S ribosomal protein L4
HAPS_RS01015	translation initiation factor IF-2	B8F3J5	infB Translation initiation factor IF-2
HAPS_RS07790	50S ribosomal protein L23	B8F757	rplW 50S ribosomal protein L23
HAPS_RS10775	ATPase AAA	B8F8J8	rarA Recombination factor protein RarA
HAPS_RS06525	Holliday junction DNA helicase RuvA	-	-
HAPS_RS07720	RNA polymerase, beta subunit	B8F741	rpoB DNA-directed RNA polymerase subunit beta
HAPS_RS01010	transcription termination factor NusA	B8F3J4	nusA Transcription termination/antitermination protein NusA
HAPS_RS07780	50S ribosomal protein L3	B8F755	rplC 50S ribosomal protein L3
HAPS_RS01395	elongation factor Ts	B8F3R8	tsf Elongation factor Ts
HAPS_RS02855	single-stranded DNA-binding protein	B8F4I1	ssb Single-stranded DNA-binding protein
HAPS_RS00670	transposase	B8F3D0	HAPS_0133 Uncharacterized protein
HAPS_RS10560	transcriptional regulator	B8F8F7	XRE family transcriptional regulator
HAPS_RS03180	50S ribosomal protein L25	B8F4P6	rplY 50S ribosomal protein L25
HAPS_RS04045	heat-shock protein	B8F560	hsrI Heat shock-like protein 15
HAPS_RS01070	tRNA s(4)U8 sulfurtransferase	B8F3K3	thiI tRNA sulfurtransferase
HAPS_RS04180	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	B8F586	mutM Formamidopyrimidine-DNA glycosylase

Tabla 38: Genes sobreexpresados en condiciones miméticas clasificados en el término GO:0003676 (*nucleic acid binding*).

9. RESUMEN

Haemophilus parasuis son bacterias Gram negativas localizadas en las vías aéreas del cerdo. En determinadas circunstancias, las cepas virulentas pueden invadir el organismo del hospedador causando una infección sistémica conocida como enfermedad de Glässer, que se caracteriza por la presencia de poliserositis fibrinosa. Además, *H. parasuis* también se puede encontrar participando en el complejo respiratorio porcino como agente oportunista en infecciones respiratorias causadas por otros agentes primarios, tanto víricos como bacterianos. La intensificación ocurrida en las últimas décadas en la industria porcina ha generado un incremento de las infecciones producidas por estos microorganismos, que se traducen en un importante impacto económico en el sector porcino en todos los países.

El control de la enfermedad de Glässer se basa en el uso de bacterinas, que presentan como principal inconveniente su escasa protección cruzada entre los diferentes serotipos (hasta la fecha 15 descritos) y cepas. La búsqueda de formulaciones vacunales alternativas, que permitan evitar los problemas asociados con las bacterinas, se ha enfocado en los últimos años en el estudio de proteínas de membrana externa.

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral ha sido la valoración de la protección inducida en el cerdo frente a la enfermedad de Glässer, por tres proteínas de membrana externa, denominadas P2, P5 y D15, todas ellas de la cepa de referencia (Nagasaki) del serotipo virulento de mayor distribución mundial (el 5). Estas proteínas fueron seleccionadas porque, en estudios previos realizados con otras cepas por diferentes grupos de investigación, habían mostrado capacidad protectora frente a *H. parasuis* en infecciones experimentales llevadas a cabo sobre ratones.

Las tres proteínas de la cepa Nagasaki fueron producidas por tecnología recombinante en *Escherichia coli* mediante su clonación y expresión en un vector tipo pBAD. Se verificó que las tres proteínas así producidas, eran reconocidas por el suero de cerdos previamente expuestos a la bacteria. A continuación, como paso previo a su empleo en el cerdo, se comprobó en conejos que las tres proteínas inducían la producción de anticuerpos capaces de reconocer la bacteria.

Tras estas comprobaciones y su producción en cantidades suficientes, se procedió a su valoración como antígenos protectores frente a la enfermedad de Glässer en el cerdo, tanto de forma individual, como en preparaciones mixtas. Para ello se recurrió a un modelo experimental de enfermedad llevado a cabo en cerdos privados de calostro.

Los animales fueron separados en grupos e inmunizados con las diferentes formulaciones de proteínas en dos administraciones espaciadas tres semanas. Además, un grupo de cerdos fue inmunizado con una bacterina comercial, y se emplearon dos grupos controles, uno no infectado ni inmunizado y otro infectado pero no inmunizado.

A las nueve semanas de edad los animales fueron sometidos a una infección experimental mediante la administración por vía intratraqueal de una dosis letal (10^8 UFCs) de la cepa Nagasaki. No hubo diferencias, en términos de supervivencia, entre los grupos de animales inmunizados con cualquiera de las formulaciones portadoras de proteínas y el grupo de animales infectado pero no inmunizado, al contrario de lo observado en el grupo de la bacterina comercial, que sirvió de control positivo de protección, y donde todos los animales sobrevivieron. No obstante, mediante ELISA, se pudo comprobar nuevamente, al igual que previamente se había observado en conejos, la producción de anticuerpos específicos en los animales inmunizados con las proteínas, sin embargo estos no resultaron protectores frente al desafío con la bacteria. Tampoco se apreciaron diferencias entre los animales inmunizados con las proteínas y el grupo de animales no inmunizados pero si infectados, respecto de la valoración de la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta inmunitaria. Tal vez la falta de protección observada para estas proteínas obedezca a su escasa exposición en la superficie de la bacteria, que se limita a lazos extracelulares de un barril- β , por lo que solamente son accesibles para el sistema inmunitario un número pequeño de epítomos.

Se llevó a cabo el estudio, mediante *RNA sequencing*, del transcriptoma bacteriano cuando *H. parasuis* se sometía a condiciones de cultivo que intentaban reproducir el ambiente natural de la infección, incluyendo restricción de hierro y una temperatura similar a la de los procesos febriles. Se pretendió detectar la sobreexpresión de genes codificantes de proteínas expuestas en la superficie bacteriana, lo que podría implicar una mayor abundancia de éstas durante la infección y, por tanto, mejores opciones de representar buenos antígenos vacunales, más allá de otras condiciones de antigenicidad e inmunogenicidad.

Aplicando esta metodología se detectaron 13 proteínas de superficie cuyos genes se veían sobreexpresados en las condiciones de estudio. Seis de ellas, TbpA, TbpB, TolC, HxuA, HxuB y HxuC, ya habían sido valoradas por otros autores como antígenos vacunales frente a la infección por *H. parasuis* en modelos murinos o porcinos (según el caso) mostrando diferentes grados de protección. Es previsible que, sino todas, alguna de

las restantes (FhuA, FimD, un autotransportador con un dominio serin-proteasa, una proteína con dominios con plegamiento tipo inmunoglobulina, otra proteína de gran tamaño con una repetición de tetratricopéptido y dos proteínas de pequeño tamaño sin presencia de dominios conocidos), puedan provocar protección en un grado aceptable, circunstancia que podrá ser valorada en estudios futuros.

Mediante citometría de flujo se llevaron a cabo estudios sobre las modificaciones originadas por la infección en los niveles de expresión de diferentes receptores dispuestos en la superficie de células mononucleares de sangre periférica, incluyendo varios TLRs, Siglecs y CD163. Los TLRs son receptores que detectan patrones moleculares propios de patógenos y su activación induce rutas de señalización que permiten el comienzo de la respuesta inmune. Como una sobreestimulación de estos receptores puede originar una exacerbación no deseable de la respuesta inmune capaz de producir un estado de sepsis, una serie de mecanismos mantienen balanceada la respuesta. Entre esos mecanismos se encuentra los Siglecs, una serie de receptores que detectan el ácido siálico que recubre las células del organismo induciendo la inhibición de las rutas de señalización iniciadas por la estimulación de receptores activadores, como los TLRs. Diferentes especies microbianas, entre las que se encontraría *H. parasuis*, han evolucionado para explotar este mecanismo inhibitorio de la respuesta inmune mediante el recubrimiento de su superficie por ácido siálico, a lo que el organismo ha respondido mediante el empleo de Siglecs modificados encargados de la detección de bacterias sializadas, como es el caso del Siglec-1. El CD163 es otro receptor que interviene en mantener balanceada la respuesta inmune que, por un lado contribuye a eliminar la hemoglobina libre circulante (que estimula la inflamación), y por otro parece que actúa como detector microbiano.

Dado el carácter sistémico de la infección por *H. parasuis* resultaba razonable que estos tres tipos de receptores desempeñasen un papel importante en el proceso, por lo que se procedió al estudio de sus niveles de expresión sobre células mononucleares de sangre periférica a partir de muestras procedentes de la infección experimental, comparando la expresión entre antes de que los animales fueran infectados y 24 horas después de la infección, cuando el proceso sistémico ya era patente. En primer lugar, con un reducido número de muestras, se cribaron varios receptores empleando dobles marcajes con anti-CD172, de forma que se pudiesen valorar en monocitos y/o linfocitos, lo que permitió observar una tendencia de incremento en los niveles de expresión tras la infección para TLR2, Siglec-3 y CD163 sobre monocitos. Posteriormente, ampliando el

número de muestras y realizando dobles marcajes con anti-CD163, se pudo confirmar las tendencias antes observadas y apreciar una relación directa entre el incremento de expresión de CD163 y los incrementos de expresión de TLR2 y Siglec-3.

Con respecto a los demás receptores estudiados (TLR4, Siglec-1, Siglec-5 sobre monocitos y Siglec-10 sobre linfocitos) no se apreciaron modificaciones significativas en sus niveles de expresión tras la infección con la bacteria, aunque en el caso de Siglec-1 si se observó la desaparición tras la infección de una subpoblación de monocitos Siglec-1⁺/CD163⁻ presente en los animales sanos.

10. SUMMARY

Haemophilus parasuis is a Gram-negative bacteria localized in pig upper respiratory tract. Under certain circumstances virulent strains can invade the host organism causing a systemic infection known as Glässer's disease, which is characterized by the presence of fibrinous polyserositis. *H. parasuis* can also be found participating in the respiratory complex disease acting as an opportunistic agent in respiratory infections caused by primary viral and bacterial agents. The intensification which has occurred over the few last decades in the pig industry has led to an increase in infections produced by this microorganism, which entails a significant economic impact in the pig industry in all countries.

Control of Glässer's disease is based on the use of bacterins, whose main drawback is their poor cross-protection between different serotypes (fifteen) and strains. The search for alternative vaccine formulations so as to avoid the problems related to bacterins has focused on the study of outer membrane proteins over the last few years.

One of the aims of this Doctoral Thesis is to evaluate the protection induced in pigs against Glässer's disease by three outer membrane proteins called P2, P5 and D15, all of them having the reference strain (Nagasaki) of the virulent serotype (5) with the highest global distribution. These proteins were selected because previous studies carried with other strains by different research groups have shown a protective capacity against *H. parasuis*, in experimental infections performed on mice.

The three proteins were produced from Nagasaki strain using recombinant DNA technology in *Escherichia coli* by cloning and expression in a vector pBAD type. It was verified that the three produced proteins were recognized by sera from pigs previously exposed to the bacterium. Afterwards, as a preliminary step to its use in pigs, it was verified in rabbits that the three proteins induced the production of antibodies capable of recognizing the bacterium.

After these checks and their production in sufficient quantities, they were evaluated as protective antigens against Glässer's disease in the pig, both individually and in mixed preparations. An experimental disease model was used for this purpose and carried out on colostrum-deprived pigs. The animals were divided into groups and immunized with the different protein formulations in two administrations every three

weeks. In addition, a group of pigs was immunized with a commercial bacterin and two control groups were used, one uninfected and unimmunized and the other infected but not immunized.

The nine-week old animals were subjected to experimental infection by intratracheally administering a lethal dose (10^8 CFUs) of Nagasaki strain. There were no differences in terms of survival between groups of animals immunized with any of the protein-bearing formulations and the group of infected but not immunized animals, contrary to what was observed in the commercial bacterin group, which served as positive protection control, where all animals survived. However, using ELISA, it was again found as had previously been observed in rabbits the production of specific antibodies in the animal immunized with proteins that were not protective against challenge with the bacteria. There were also no differences between the animals immunized with the proteins and the group of non-immunized but infected animals with regard to the evaluation of the expression of different genes related to the immune response. The lack of protection observed for these proteins may be due to their poor exposure on the surface of the bacterium, which is limited to extracellular loops of a β -barrel, and thus only a small number of epitopes is accessible to the immune system.

Using RNA sequencing, a bacterial transcriptome study was performed when subjected to culture conditions attempting to reproduce the natural environment of infection, including an iron restriction and a temperature similar to a feverish process. It was intended to detect the overexpression of genes encoding exposed proteins on the bacterial surface which could imply an increased abundance of these proteins during the infection and, therefore, better options to represent good vaccine antigens beyond other conditions of antigenicity and immunogenicity.

Thirteen surface proteins, whose genes were overexpressed under the study conditions, were detected when applying this method. Six of them, TbpA, TbpB, TolC, HxuA, HxuB and HxuC had already been assessed by other authors as vaccine antigens against infection by *H. parasuis* in murine or porcine models (depending on the case) showing different degrees of protection. It may be expected that some or all of the remaining ones (FhuA, FimD, an autotransporter with a serine protease domain, a protein with Immunoglobulin-like fold domains, another large protein with a tetratricopeptide repeat and two small proteins without the presence of known domains) could provide protection to an acceptable degree which should be evaluated in future studies.

Flow cytometry studies were carried out in order to evaluate the modifications caused by infection in the expression levels of different receptors arranged on the surface of peripheral blood mononuclear cells, including several TLRs, Siglecs and CD163. TLRs are receptors that detect pathogen-associated molecular patterns and their activation induces signaling pathways which allow for the onset of the immune response. As an overstimulation of these receptors, it may lead to an undesirable exacerbation of the immune response capable of producing a state of sepsis, a number of mechanisms maintaining the balanced immune response. Among these mechanisms are the Siglecs, a series of receptors which detect the sialic acid that covers the cells of the organism inducing the inhibition of the signaling routes initiated by the stimulation of activating receptors, such as TLRs. Different microbial species, including *H. parasuis*, have evolved to exploit this mechanism inhibiting the immune response by coating its surface sialic acid to which the body has responded by using modified Siglecs responsible for detection of sialidated bacteria, as is the case of Siglec-1. CD163 is another receptor involved in maintaining a balanced immune response which, on the one hand, helps to eliminate the circulating cell-free hemoglobin (which stimulates inflammation), while, on the other hand, it acts as a microbial detector.

Given the systemic nature of *H. parasuis* infection it was reasonable for these three types of receptors and should play an important role in the process, so we proceeded to study their expression levels on mononuclear peripheral blood cells of samples from the experimental infection, comparing the expression before the animals were infected and 24 hours afterwards when the systemic process had already been patented. Firstly, with a small number of samples, several receptors were screened using double labeling with anti-CD172 so that they could be evaluated on monocytes and / or lymphocytes, which allowed us to observe a tendency to increase in the expression levels after infection from TLR2, Siglec-3 and CD163 on monocytes. Subsequently, by increasing the number of samples and performing double labeling with anti-CD163, the previously observed trends could be confirmed and also a direct relationship between the increase in CD163 expression and the increases in expression of the other receptors, TLR2 and Siglec-3.

With regard to the other receptors studied (TLR4, Siglec-1, Siglec-5 on monocytes and Siglec-10 on lymphocytes) there were no significant changes in their expression levels after infection with the bacteria, although the disappearance of a

subpopulation of monocytes Siglec-1 + / CD163 -, which is present in healthy animals, was observed after infection.