



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

Centro de Investigación en Biotecnología

**Ensamblaje del genoma y análisis de la anotación funcional de
Klebsiella sp., para identificar los genes que le confieren
actividad anticoccidiana**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

PAOLINA LIZETH LOZADA MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2018

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al **Dr. Edgar Dantán González** por brindarme la confianza y oportunidad de realizar este proyecto.

A los integrantes de mi comité tutorial, **Dra. Patricia Mussali, Dra. Irene Perea, Dr. Augusto Trujillo,** y el **Dr. Ramón Suarez** por su tiempo, consejos y sugerencias que permitieron mi desarrollo tanto personal como profesional y la culminación de este trabajo.

A la **Dra. Nancy Rivera**, que más que una doctora, también fue amiga y consejera en esta etapa, usted es una de las personas a las que le debo gran parte de mi conocimiento y experiencia, es sin duda parte fundamental de este proyecto. Le agradezco los consejos y esas charlas interminables de positivismo que ayudaron a mantenerme constante y salir adelante, sin usted y su motivación no lo hubiera logrado. MUCHAS GRACIAS.

A la **Dra. Deyanira Pérez**, por enseñarme, escucharme, apoyarme y ser parte de esta etapa. En lo personal, por enseñarme a hacer frente a los problemas y situaciones negativas, es una excelente doctora, consejera y amiga.

A la **TLIF. Lucero Valladares**, por tu valioso conocimiento y experiencia que me brindaste, por tu ayuda y apoyo incondicional, por tu amistad y la confianza que me das, un papel no acredita quienes somos, pero sabes que comparto el logro contigo, porque eres parte de ello.

AGRADECIMIENTOS FAMILIARES

A mis padres **Alfredo Lozada Campos** y **Raquel Mendoza Díaz**, por darme todo el apoyo y la motivación en cada una de las etapas de mi vida, una meta cumplida y un logro que les pertenece, porque es por y para ustedes.

A mi esposo **Luis Fernando Cruz García** por todo el apoyo, fuerza, motivación, entusiasmo y amor que me has brindado, porque fuiste y eres una parte primordial en esta etapa y principalmente de mi vida. En las buenas, en las malas y por todas las metas que nos faltan. Te amo.

Al angelito que formo parte de la motivación para poder terminar este ciclo, que estuvo conmigo al final del camino y me dio la fuerza para seguir adelante. Gracias por permitirme vivir la hermosa experiencia de tenerte un momento conmigo.

A mi persona favorita **Paula Elena Lozada Alcaraz**, porque, aunque aún no lo comprendas, me inyectas las ganas de superarme cada día.

A mi familia en general por estar conmigo apoyando y motivando en todo momento.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A **Nancy Rodríguez** por tu compañía, amistad, enseñanza y experiencias compartidas, por tu apoyo incondicional y por ser esa excelente persona que eres día a día a pesar de las circunstancias, por compartir buenos y malos ratos, eres como la hermana que no tuve.

Al **Biol. Daniel Rivera Mendoza** por todos los momentos que vivimos juntos en el labo, por ser un apoyo incondicional y estar ahí cuando necesitaba que alguien me escuchara, porque más que compañero te convertiste en mi amigo.

A los **M. en B. Rosalba Salgado** y **M en B. Abraham Rivera**, por compartir su conocimiento, experiencia y amistad conmigo, y por hacernos parte de la experiencia que es tener a esa hermosa personita.

A mis compañeros de laboratorio **Abimael, Fernando, Rebeca** y **Vichi** por todo el apoyo que brindaron.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. Protozooario <i>Eimeria</i> sp.	10
2.1 Ciclo de vida de <i>Eimeria</i> sp.....	11
2.2 Características del ooquiste.	12
3. Control de la coccidiosis.....	14
3.1 Productos anticoccidiales.....	14
3.2 Ionóforos	14
3.3 Compuestos sintéticos	15
3.4 Vacunas	16
3.5 Alternativas naturales	17
3.6 Extractos herbales	17
3.7 Aceites esenciales.....	18
4. Desarrollo de nuevas alternativas en el control de la coccidiosis.....	19
5. ANTECEDENTES DIRECTOS	20
5.1 Análisis <i>in vivo</i> de <i>Meyerozima guillermondii</i> contra el protozooario <i>Eimeria</i> sp.	20
5.2 Identificación de microorganismos aislados de sustratos de heces de aves y suspensiones vacunales	21
5.3 Género <i>Klebsiella</i>	22
6. JUSTIFICACIÓN.....	24
7. HIPÓTESIS.....	25
8. Objetivo general	25
8.1 Objetivos particulares	25
9. ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	26
9.1 Mantenimiento de la cepa <i>Klebsiella</i> sp	26
9.2 Secuenciación del genoma de <i>Klebsiella</i> sp.	26
9.3 Ensamble del genoma de <i>Klebsiella</i> sp	26
9.4 Anotación del genoma de <i>Klebsiella</i> sp	27
9.5 Análisis filogenético con marcadores moleculares.....	27
9.6 Curva de crecimiento	27
9.7 Obtención del extracto intracelular.....	28
9.8 Tratamiento con tripsina.....	28
9.9 Análisis de la actividad anticoccidiana.....	28
9.10 Búsqueda de los genes involucrados	29
9.11 Corroboración de la actividad contra ooquistes en los genes candidatos	30

10. RESULTADOS	31
10.1 Secuenciación del genoma de <i>Klebsiella</i> sp.	31
10.2 Ensamble del genoma de <i>Klebsiella</i> sp.	34
10.3 Anotación del genoma de <i>Klebsiella</i> sp	36
Abreviaturas. CDS: secuencias codificantes, tRNA: ácido ribonucleico de transferencia, rRNA: ácido ribonucleico ribosomal.....	37
10.4 Identificación molecular de <i>Klebsiella</i> sp.	37
10.5 Curvas de crecimiento.....	39
10.6 Análisis de la actividad anticoccidiana en las cepas KpMx-1(<i>K. pneumoniae</i>) y KvMx -2 (<i>K. variicola</i>)	40
10.7 Bioensayos con <i>pellet</i> celular en los tiempos de crecimiento seleccionados	43
10.8 Bioensayos realizados con el sobrenadante del cultivo en los tiempos seleccionados.....	45
10.9 Bioensayos con proteína	46
10.10 Bioensayos con el extracto intracelular tratados con tripsina	47
10.11 Búsqueda de los genes candidatos a partir de la anotación de las cepas utilizadas en el estudio	49
11. Discusión	54
12. Conclusiones.....	59
13. Perspectivas	60
14. Literatura citada	61
14.1 Citas de Internet	64

Índice de Tablas

Tabla 1.	Tropismo tisular de las especies que parasitan al ave.....	10
Tabla 2	Composición de las paredes oquísticas de las especies <i>E. tenella</i> y <i>máxima</i>	13
Tabla 3	Características generales de la pared del oociste del genero <i>Eimeria</i>	13
Tabla 4	Drogas anticoccidiales y su modo de acción.....	16
Tabla 5	Genomas depositados en la base de datos del GeneBank pertenecientes al género <i>Klebsiella</i>	24
Tabla 6	Características que se tomaran en cuenta para la búsqueda de los genes con actividad anticoccidiana contenidos en <i>Kebsiella</i> sp.	30
Tabla 7	Características del ensamble del genoma con y sin el depurado de contigs	36
Tabla 8	Características de la anotación del genoma de <i>Klebsiella</i> sp.	37
Tabla 9	Genes candidatos identificados a partir del Core de los tres genomas.....	52

Índice de Figuras

Figura 1	Ciclo de vida del protozoario <i>Eimeria</i> sp.	12
Figura 2	Bioensayos realizados con diferentes fracciones del cultivo de <i>M. guilliermondii</i>	21
Figura 3	Imágenes microscópicas de ooquistes incubados con las cepas <i>Klebsiella</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp, y <i>Escherichia</i> sp., <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	22
Figura 4	Evaluación de la calidad en las secuencias realizado por el programa FastQ....	32
Figura 5	Gráfica del porcentaje de GC	33
Figura 6	Gráfica de la calidad de las secuencias editadas con el programa <i>Dynammictri</i>	34
Figura 7	Árbol filogenético realizado a partir de secuencias concatenadas con los genes <i>gyrA</i> , <i>mdh</i> , <i>parC</i> , <i>rpoB</i> y <i>16s</i>	39
Figura 8	Cinética de crecimiento.....	40
Figura 9	Porcentaje de los ooquistes íntegros obtenidos en los conteos realizados a las 0, 24 y 48 horas del bioensayo incubado con las cepas KpMx-1 y KvMx-1.....	43
Figura 10	Bioensayos realizados con el <i>pellet</i> celular del cultivo tomado en diferentes tiempos de incubación	45
Figura 11	Bioensayos realizados con el sobrenadante del cultivo tomado a las 4, 6 y 9 horas de incubación.....	46
Figura 12	Porcentaje de ooquistes íntegros obtenidos en los conteos a las 0, 24 y 48 horas del bioensayo realizado con el extracto intracelular	47
Figura 13	Electroforesis de la digestión con tripsina en las muestras del extracto intracelular	48
Figura 14	Bioensayos realizados con extracto intracelular tratado con tripsina, se realizaron conteos a las 0 y 48 horas.....	49
Figura 15	Diagrama de la relación de los genomas de las tres cepas del genero de <i>Klebsiella</i> utilizadas en el estudio.	50
Figura 16	Ooquistes íntegros observados en los bioensayos realizados con el extracto intracelular obtenido a partir de un cultivo incubado por 12 horas a 37°C	54

RESUMEN

La coccidiosis es una enfermedad de significancia económica dentro de la industria avícola, debido a que causa una baja productividad de carne. Esta enfermedad es inducida por protozoarios del genero *Eimeria* sp. que infectan al ave, invadiendo los tejidos epiteliales del intestino provocando cuadros clínicos con inflamación, pérdida de fluidos, diarreas continuas, deshidratación, enteritis necrótica y mal absorción de nutrientes, lo que lleva a una pérdida de peso considerable e inclusive una mayor susceptibilidad a bacterias patógenas. Los métodos que se emplean para su control, atacan los estadios que desarrollan dentro del ave, sin embargo, éstos han llegado a generar desventajas, como cepas resistentes, altos costos para su obtención, bioacumulación e inespecificidad. Debido a esto, la importancia por mantener el control de la coccidiosis en la producción aviar ha provocado que los pollos sean alimentados intensivamente con agentes anticoccidiales desde su crianza. Sin embargo, los productores avícolas carecen de la información oportuna acerca de los anticoccidianos, llevándolos a un mal manejo de estos, que ha dado como resultado, el desarrollo de cepas de coccidia con resistencia a los medicamentos, incrementado así una presión para obtener nuevas drogas que permitan tener productos avícolas confiables. En el laboratorio de Estudios Ecogenómicos se aisló de una cama aviar en Tehuacán Puebla, una cepa que fue clasificada dentro del género de *Klebsiella*, que presentaba una actividad antiprotozoaria.

Se realizó el ensamble del genoma de *Klebsiella* sp. con una longitud de 5.8 Kb en 34 contigs, se identificó molecularmente como *Klebsiella oxytoca*, y se nombró Kox Ac. Las cepas, KpMx-1 y KvMx-2, utilizadas para realizar una comparación genómica, mostraron una actividad similar a la cepa Kox Ac, por lo que se decidió involucrarlas en el estudio. Se realizaron bioensayos con el cultivo, el pellet celular, sobrenadante y extracto intracelular de cada una de las cepas, obteniendo características similares en la actividad producida por las tres. Adicionalmente, la fracción del extracto intracelular se sometió a una digestión con tripsina, y por separado, se realizó una inhibición de proteasas con el coctel M221 de la marca AMRESCO. Al realizar los bioensayos correspondientes en cada una de las condiciones, se observó una disminución considerable de la actividad en las tres cepas. Con base en lo anterior, se realizó la comparación genómica de las tres cepas, obteniéndose un total de 2048 secuencias compartidas entre éstas (Core), donde se llevó a cabo la búsqueda preliminar de las posibles moléculas involucradas en la actividad, teniendo como resultado secuencias que presentan función y homología en secuencia o dominio catalítico con porinas, lipasas, oxidoreductasas y principalmente proteasas que podrían estar involucradas en dicha actividad.

1. INTRODUCCIÓN

La coccidiosis es una enfermedad de significancia económica dentro de la industria avícola, debido a que causa una baja productividad de carne. Esta enfermedad es inducida por protozoarios del género *Eimeria* sp. que infectan al ave, invadiendo los tejidos epiteliales del intestino provocando cuadros clínicos con inflamación, pérdida de fluidos, diarreas continuas, deshidratación, enteritis necrótica y mal absorción de nutrientes, lo que lleva a una pérdida de peso considerable e inclusive una mayor susceptibilidad a bacterias patógenas (Quiroz *et al.*, 2015; Williams 2002).

Las tasas de contagio aumentan de manera rápida, debido a que las granjas que se encuentran diseñadas para la producción avícola implican con frecuencia la elevación de un gran número de aves en espacios pequeños (Blake *et al.*, 2014), provocando el consumo accidental de los ooquistes expulsados por animales infectados, puesto que la comida que las aves consumen se encuentra en el mismo lugar donde defecan (Mai *et al.*, 2009).

Las aves son alimentadas intensivamente con agentes anticoccidiales desde su crianza para poder prevenir la aparición dicha enfermedad (Quiroz *et al.*, 2015). No obstante, la mala información del manejo de estos productos anticoccidianos llevo a la emergencia de cepas resistentes dando como consecuencia que la efectividad de prevención de dichos productos se vea reducida, incrementado así una presión para obtener nuevas drogas que permitan tener productos avícolas confiables.

2. Protozooario *Eimeria* sp.

El protozooario del género *Eimeria* es transmitido a células hospederas por estados invasivos extracelulares, en estos estados el protozooario cuenta con formaciones especializadas de organelos secretores, que dan lugar al polo apical, que es característico del *Phylum Apicomplexa* (Shirley, 2005; Yuño, 2013). Por medio del polo apical, el protozooario se adhiere a las células epiteliales del intestino del ave, seguido de una rápida y progresiva internalización, que simultáneamente, es acompañada de la formación de la vacuola parasitaria, donde éste llevará a cabo su división y proliferación dentro de la célula (Juárez, 2016).

Se han identificado siete especies del género *Eimeria* que parasitan a las aves: *E. acervulina*, *E. praecox*, *E. mitis*, *E. máxima*, *E. necatrix*, *E. tenella* y *E. brunetti*, cada uno infecta diferentes lugares en el intestino del ave (Tabla 1) (Quiroz *et al.*, 2015).

Tabla 1.

Tropismo tisular de las especies que parasitan al ave.

<i>Eimeria</i> sp.	Localización en la mucosa	Localización en el intestino
<i>E. acervulina</i>	Criptas de epitelio	Duodeno
<i>E. brunetti</i>	Vellosidades epiteliales	Íleon, recto y cloaca
<i>E. maxima</i>	Criptas de epitelio	Yeyuno
<i>E. imitis</i>	Vellosidades epiteliales	Porción distal del intestino delgado
<i>E. necatrix</i>	Criptas de epitelio	Esquizoitos en yeyuno y gametos en ciegos
<i>E. praecox</i>	Vellosidades epiteliales	Duodeno
<i>E. tenella</i>	Criptas de epitelio	Ciego

Tomado de Yuño, 2013

2.1 Ciclo de vida de *Eimeria* sp.

El ciclo de vida del protozooario *Eimeria* sp. se caracteriza por tener dos estados de desarrollo, un estado exógeno, donde el protozooario se encuentra en el ambiente, y un estado endógeno que se realiza dentro del hospedero. El ciclo comienza cuando el ooquiste, estado exógeno, es consumido por el ave y una vez dentro es roto por los movimientos mecánicos del buche y los ácidos biliares, esta acción permite la salida de los esporozoitos, que a su vez invaden las células epiteliales del intestino y comienza la formación de la vacuola parasitoide o esquizonte, donde se da lugar a la formación de merozoitos, estos últimos, al alcanzar un número considerable, ejercen una presión dentro de la célula huésped provocando la lisis de la membrana celular y permitiendo la liberación de la primera generación de merozoitos, que contienen la capacidad de invadir nuevas células (Chapman *et al.*, 2002; García *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2015). Esta primera etapa se conoce como ciclo asexual, después de dos o hasta cuatro generaciones de merozoitos, se produce la fase sexual, donde los merozoitos se diferencian en gamontes, es decir los gametos tanto masculinos (microgametos) como femeninos (macrogametos) (Chapman *et al.*, 2013; García *et al.*, 2008). El macrogametocito que se diferencia en gameto femenino da lugar a un sólo macrogameto, sin embargo, los microgametocitos deben sufrir varias divisiones (esporogonia) para dar lugar a varios microgametos. El microgameto fecunda el macrogameto formando un cigoto que dará lugar al ooquiste dentro del intestino del ave y posteriormente será expulsado al ambiente por medio de las heces fecales, una vez fuera del hospedero, el ooquiste comienza la esporulación en presencia de humedad, oxígeno y calor (García *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2015) (Figura 1).

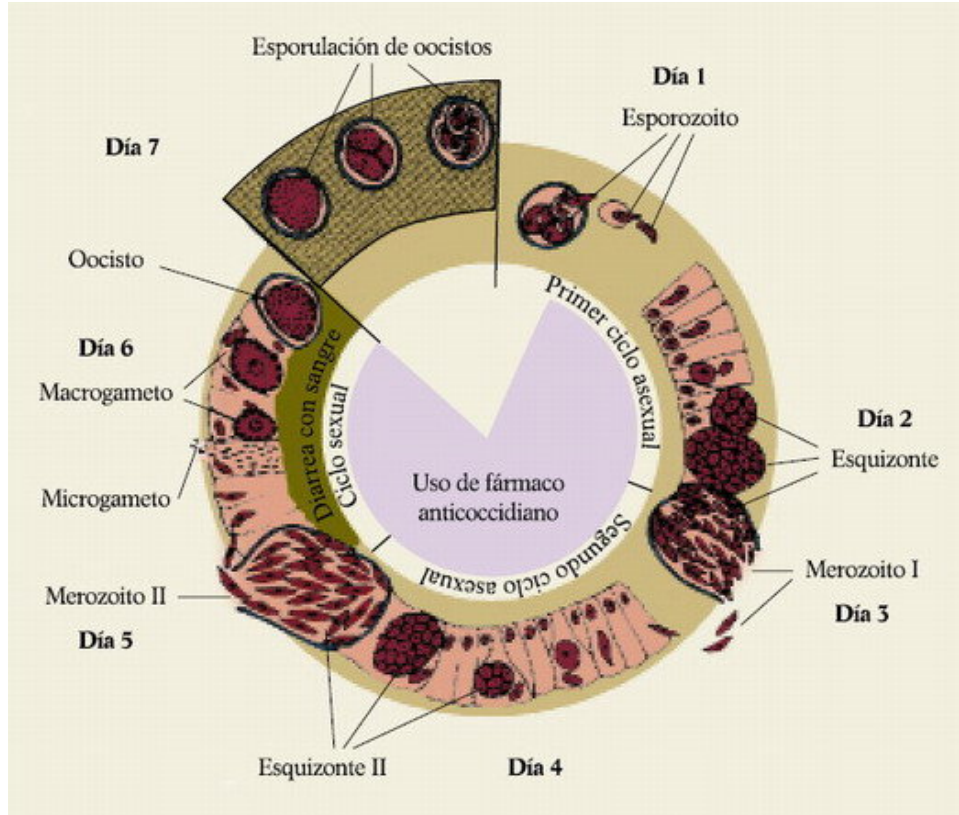


Figura 1. Ciclo de vida del protozoario *Eimeria* sp. Éste se desarrolla en 7 días, pasando desde la fase del esporozoito hasta la diferenciación de los gametos que dan lugar al oocisto, el cual es expulsado al ambiente en el séptimo día. Tomado de Yuño y Gorgoza, 2013.

2.2 Características del ooquiste.

Los parásitos de coccidia poseen varias características, tales como su estado asexual y los organelos que forman el complejo apical, sin embargo, también cuentan con un estado característico llamado ooquiste, que es descrito como extremadamente resistente, ya que es capaz de persistir en el ambiente por prolongados periodos de tiempo en condiciones adversas, incluso se ha llegado a observar que es resistente a daños mecánicos y químicos (Chapman *et al.*, 2013; Cha *et al.*, 2014). También se han reportado estudios donde analizan la composición química y física general del ooquiste, tanto para las especies de *E. tenella* y *E. maxima*, (Tabla 2), así como también

para el género *Eimeria* (Tabla 3). El ooquiste alberga una pared o membrana externa con un grosor de aproximadamente 500 a 600 nm, pero puede compactarse a 200 nm o menos en presencia de temperaturas bajas, y una pared interna que mide 40 nm de grosor, entre la pared externa e interna existe una zona intermedia que mide aproximadamente 40 nm que separa ambas estructuras (Ferguson *et al.*, 2003). Las paredes del ooquiste también son resistentes a la proteólisis, pero son permeables a pequeñas moléculas solubles en agua y en lípidos, algunos de los ejemplos mayormente conocidos son amonio y bromuro metílico (Chapman *et al.*, 2013; Mai *et al.*, 2009).

Tabla 2.

Composición de las paredes ooquisticas de las especies E. tenella y E. maxima (Mai et al 2009)

Composición de la pared ooquistica de las especies <i>E. tenella</i> y <i>E. maxima</i>		
	% de metabolitos	
	<i>E. tenella</i>	<i>E. maxima</i>
Lípidos	1.6	1.4
Proteínas	97.8	98.3
Carbohidratos	0.6	0.3

Tabla 3.

Características generales de la pared del ooquiste del género Eimeria (Bushkin et al 2012)

Características generales	
Pared interna	Pared externa
Presenta una estructura electro luciente a través de una microscopia electrónica de transmisión, y está formada por una estructura trabecular, contiene principalmente proteínas y lípidos, aunque también se han encontrado carbohidratos en bajas concentraciones	Esta constituido principalmente por proteínas esclerotizadas con quinona, así como un porcentaje alto de glusidos (β -glucano)

Estas paredes se desarrollan a partir de dos organelos llamados cuerpos formadores de pared tipo I y II (WFB I y II, por sus singlas en inglés), estos

organelos se encuentran presentes exclusivamente en los macrogametos (Ferguson *et al.*, 2003). El cuerpo formador de pared tipo I, se alberga en el aparato de Golgi y da lugar a la pared externa del ooquiste maduro. El tipo II se encuentra cerca del retículo endoplasmático rugoso y da lugar a la pared interna del ooquiste maduro, También unido a la vacuola se encuentra el cuerpo formador de velo, el cual es secretado en la maduración del macrogameto, envolviendo al macrogameto cuando éste es fecundado y permaneciendo aún alrededor de ooquiste antes de ser expulsado al ambiente, una vez fuera del hospedero el velo se pierde dejando desnudo al ooquiste (Mai *et al.*, 2009).

3. Control de la coccidiosis.

Esta enfermedad ha sido controlada usando anticoccidianos químicos o vacunas que son colocados en la comida o en el agua y que son ingeridos por las aves al alimentarse (Alaa *et al.*, 2015).

3.1 Productos anticoccidiales.

Diversos estudios se han llevado a cabo en la búsqueda de alternativas para el control de la coccidiosis, dando lugar a diversos productos que son capaces de controlar esta enfermedad y se clasifican en coccidioestatos, que inhiben el crecimiento de los coccidios y coccidiocidas que interrumpen su ciclo biológico provocando su muerte (Cha *et al.*, 2014; Yuño *et al.*, 2008).

3.2 Ionóforos

También conocidos como antibióticos poliéter, éstos son producidos mediante la fermentación de algunos microorganismos tales como

Streptomyces sp. o *Actinomyces* sp. (Peek *et al.*, 2011; Yuño *et al.*, 2008) y actúan destruyendo al parásito al desestabilizar la concentración de iones importantes como el sodio y potasio, lo que altera la permeabilidad de la membrana y provoca una ósmosis, lisando así al parásito (Chapman *et al.*, 2014; Peek *et al.*, 2011). Sin embargo, los ionóforos no son específicos para atacar al parásito, sino que pueden llegar a dañar las células epiteliales del hospedero generando efectos secundarios, tales como, el desequilibrio en la concentración de iones provocando la lisis de la célula epitelial.

3.3 Compuestos sintéticos

Estos compuestos son producidos por síntesis química y cada uno de ellos tienen un modo de acción diferente contra el metabolismo del parásito (Tabla 4), no obstante, el uso continuo de estos productos ha generado un desarrollo de cepas resistentes, e incluso existe una preocupación en salud pública por los residuos de estas drogas, que se han llegado a encontrar bioacumuladas en la carne del pollo (Bozkurt *et al.*, 2012).

Tabla 4.
Drogas anticoccidiales y su modo de acción

Anticoccidiano	Estado de vida afectado	Modo de acción	Especies estudiadas de <i>Eimeria</i>
Sulfonamidas	2° generación de esquizontes	Inhibición de la vía de ácido fólico	<i>E. tenella</i>
Amprolium	2° generación de esquizontes	Antagonismo de tiamina	<i>E. tenella</i>
Decoquinato	Esporozoito	Inhibición de la respiración por el bloqueo del transporte de electrones a través de la membrana mitocondrial	<i>E. tenella</i>
Clopidol	Esporozoito	Afecta el transporte de electrones	<i>E. tenella</i>
Benzeneminas	Esporozoito	Estrés oxidativo	Varias especies
Monesina	Esporozoito	Flujo de iones de sodio	<i>E. tenella</i>
Robenidine	Múltiples estados	Se une a proteínas y afecta la mitocondria del parásito	Varias especies
Halofuguno	Estado asexual	Alcaloide, puede suprimir la producción de ooquistes	Varias especies
Salinomucina	Esporozoito y merozoitos	Transporte de cationes a través de la membrana celular	Varias especies
Diclazuril	Estado asexual y sexual	Análogos de nucleótidos	<i>E. tenella</i>
Toltrazuril	Múltiples estados	Afecta la plasticidad del genoma	Varias especies

Fuente: Bozkurt *et al.*, 2013

3.4 Vacunas

Las vacunas se caracterizan por contener organismos vivos, ooquistes esporulados y no esporulados. Existen dos tipos, vacunas no atenuadas que comprenden parásitos obtenidos bajo crecimiento dentro del laboratorio u obtenidos desde el ambiente, pero no tienen ninguna modificación en su virulencia natural, y las vacunas atenuadas que contienen parásitos con una

virulencia reducida artificialmente, esto se logra por medio de una selección de organismos llamados precoces o por el paso de los parásitos a los embriones (Peek *et al.*, 2011; Yuño *et al.*, 2008). La eficacia de las vacunas está dada por el método de administración; sin embargo las vacunas atenuadas o no atenuadas presentan grandes desventajas, como no contener todas las especies de *Eimeria* que son capaces de infectar al ave, esto debido a que las aves que son más jóvenes rara vez contienen las especies tales como *E. necatrix* y *E. Brunetti* o porque algunas especies tales como *E. mitis* y *E. praecox* han sido subestimadas en la importancia comercial y junto con *E. máxima* han sido probadas resultando no particularmente patógenas (Yuño *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque éstas no se consideren altamente patógenas, cualquier cepa de las 7 especies de *Eimeria* que se introduzca al ave y no esté presente en la vacuna puede ser capaz de causar la enfermedad (Cha *et al.*, 2014).

3.5 Alternativas naturales

Se han utilizado diversas alternativas naturales como extractos de plantas, hongos y algunos probióticos que ayudan a reducir el problema que causa la coccidiosis, incluso, muchos de estos compuestos son usados como suplementos en la alimentación diaria de los animales, causando varios efectos en estos, tales como la estimulación del sistema inmune. Algunos actúan como anti-inflamatorios o antioxidantes, y otros inducen al daño citoplasmático (Quiroz *et al.*, 2015).

3.6 Extractos herbales

El estudio de los extractos herbales ha tomado un papel importante dentro de la búsqueda de nuevas alternativas para el control de la coccidiosis,

debido a que han mostrado un efecto anticoccidiano y no se ha desarrollado hasta la fecha resistencia contra estas moléculas. Siendo las especies de Sábila (*Aloe vera*, *Artemisa*, *azadirchta*), Remolacha (*Beta vulgaris*), Planta de té (*Camellia sinensis*), Cúrcuma (*Curcuma longa*), Rudbeckia morada (*Echinacea purpurea*), Orégano (*Origanum vulgare*), Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), Trigo (*Triticum aestivum*), Yuca (*Yucca schidigera*) que se han reportado, incluso, algunas mezclas de estos extractos ya se encuentran comercialmente disponibles (Abbas *et al.*, 2012; Quiroz *et al.*, 2015). Sin embargo, no se conoce exactamente su modo de acción, algunos autores proponen que tal vez sea acción de los metabolitos secundarios de las plantas y que incluso algunos de ellos son capaces de aliviar los daños causados en las células epiteliales, brindándole al pollo una recuperación eficaz y rápida (Bozkurt *et al.*, 2013).

3.7 Aceites esenciales

Se tiene registro de que los terpenos presentes en estos aceites contienen actividad contra los parásitos de *Eimeria* sp. e incluso los aceites esenciales de artemisa, tomillo y clavo llegan a destruir el ooquiste de este género (Barbour *et al.*, 2014; Quiroz *et al.*, 2015). Por desgracia el método para la obtención de estos aceites implica el uso de grandes cantidades de las plantas, lo que hace de su empleo un medio costoso (Bozkurt *et al.*, 2013).

4. Desarrollo de nuevas alternativas en el control de la coccidiosis

En la actualidad el control de la coccidiosis se basa en la administración de los medicamentos profilácticos anticoccidianos anteriormente descritos; sin embargo, la resistencia que algunas cepas de la especie *Eimeria* han desarrollado, además de la demanda de carne libre de residuos, provocan la búsqueda de nuevas alternativas para el control de ésta.

Los estudios que hoy se realizan para este fin, utilizan diversas herramientas desarrolladas dentro del área de la biotecnología y la genómica, tal como la secuenciación y el análisis de los genomas del protozooario extraídos en diferentes estadios de éste, donde se han podido identificar un número de antígenos prometedores que se utilizan en estudios experimentales, logrando grandes avances en el desarrollo de las vacunas, que son conocidas como las vacunas de tercera generación, éstas tienen como objetivo inducir una fuerte inmunidad humoral, así como también, una inmunidad celular (Song *et al.*, 2015), evitando la invasión del protozooario a la célula huésped, ya que los antígenos reconocen diversas proteínas que son excretadas por el protozooario en dicho momento. Sin embargo, la mayoría de éstos sólo están siendo desarrolladas para atacar ciertas especies, tales como *E. tenella* y *E. máxima* (Huang *et al.*, 2015; Geriletua *et al.*, 2015), y deben ser introducidas al ave, ya que atacan diversos estadios del protozooario en el estado endógeno, específicamente en el esporozoito y merozoito (Oakes *et al.*, 2013).

Es por esto que la búsqueda por una alternativa segura y eficaz sigue siendo el enfoque en los lugares donde se realizan investigaciones contra la coccidiosis, ya que se busca obtener un producto que ayude al control de dicha

enfermedad de una manera rápida, efectiva y que no sea necesario ser administrado al ave, esto con el fin de conseguir una producción de carne libre de residuos.

5. ANTECEDENTES DIRECTOS

5.1 Análisis *in vivo* de *Meyerozima guillermondii* contra el protozoario *Eimeria* sp.

Dantán y *col.*, (2015), observaron que algunos microorganismos, provenientes de una suspensión vacunal, causaban daño a las paredes del ooquiste, a partir de esto, realizaron un aislamiento para obtener los microorganismos involucrados en esta actividad, dando como resultado el hallazgo de una levadura, que fue identificada como *Meyerozima guillermondii*. Realizaron bioensayos para obtener un estimado del daño causado, donde utilizaron un número aproximado de 100 000 ooquistes y observaron que el porcentaje de ooquistes íntegros, ooquistes que no presentaban alteración en las paredes, disminuía a medida que aumentaba la densidad del cultivo desde un 70%, a una D.O._{.600 nm} 1, hasta un 40%, en D.O._{.600 nm} 2, de ooquistes íntegros, además, la actividad se mantenía a las 48hrs (Figura 2).

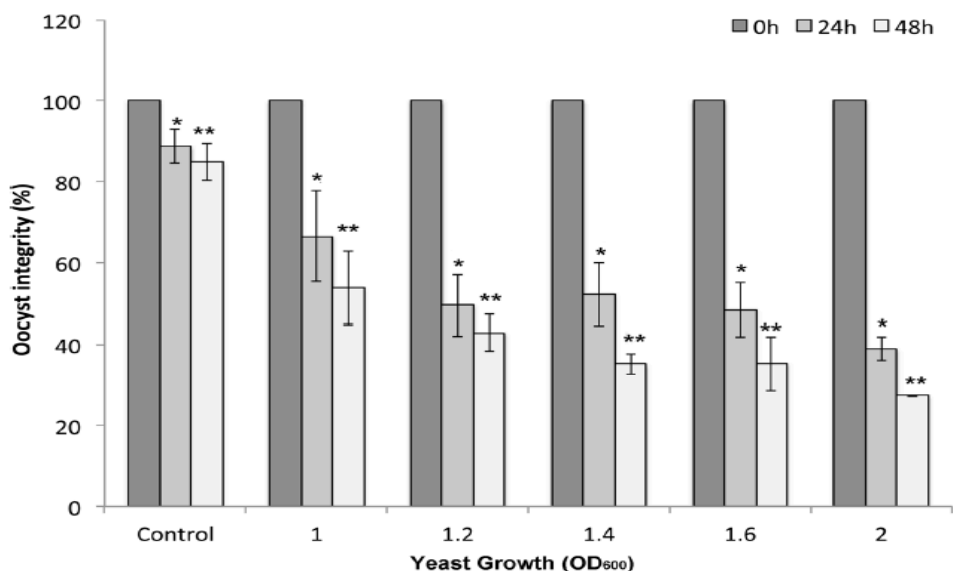


Figura 2. Bioensayos realizados con diferentes fracciones del cultivo de *M. guilliermondii*. Tomado de Dantán y Quiroz, 2015.

5.2 Identificación de microorganismos aislados de sustratos de heces de aves y suspensiones vacunales

Gama, (2015), aisló microorganismos provenientes de camas aviares y de suspensiones vacunales que alteraban la integridad de ooquistes pertenecientes al género *Eimeria*. Las cepas obtenidas a partir de este aislamiento fueron identificadas como *Arthrobacter*, *Klebsiella* sp. y *Escherichia coli*.

Para corroborar la actividad, Gama realizó bioensayos con cada una de las cepas, obteniendo que cada una de estas, causaba un daño con diferentes características en las paredes ooquistísticas (Figura 3).

De los microorganismos aislados, la cepa del género *Klebsiella* sp. presenta una actividad anticidiana, manteniendo un porcentaje promedio de ooquistes dañados del 40 % a las 24 horas y manteniendo la actividad a las 48 horas con

un porcentaje promedio mayor al 60%, porcentajes muy similares a los obtenidos con la levadura *M. guilliermondii*.

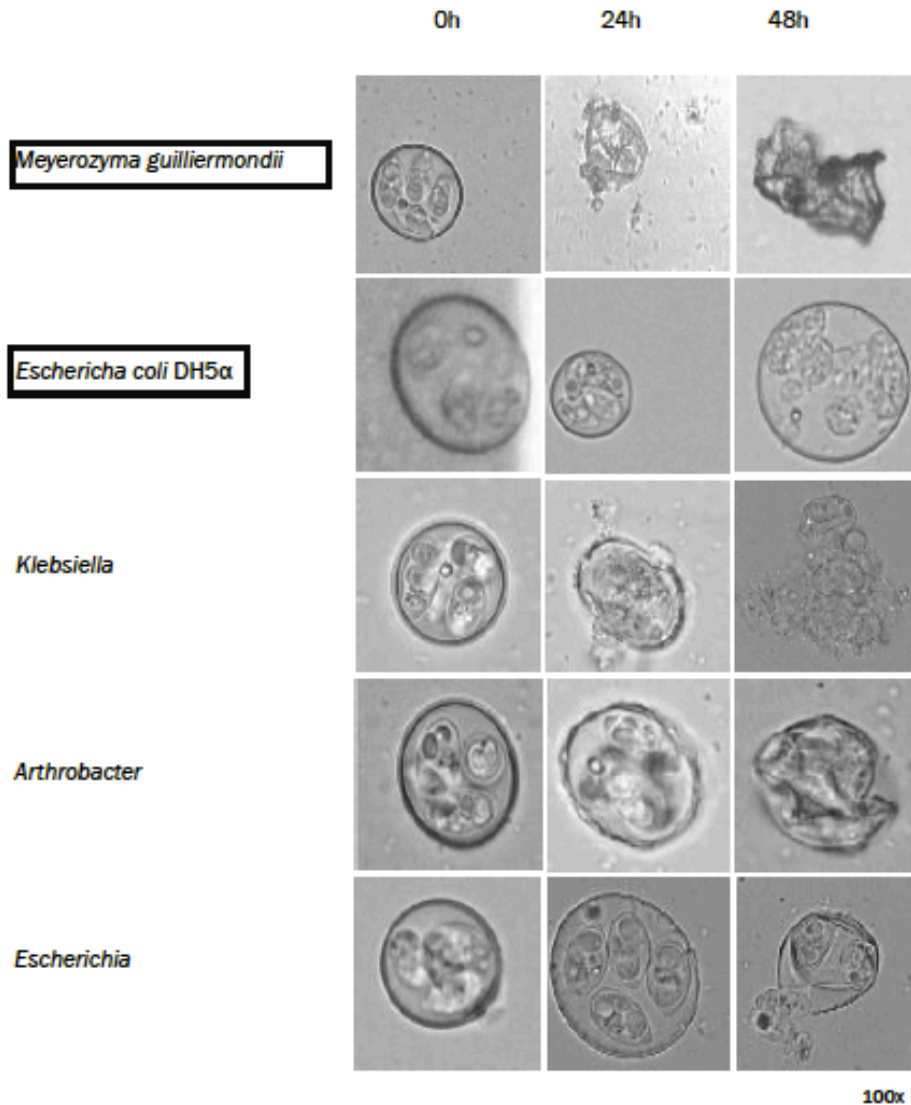


Figura 3. Imágenes microscópicas de ooquistes incubados con las cepas *Klebsiella* sp., *Arthrobacter* sp, y *Escherichia* sp., *Meyerozyma guilliermondii* (control positivo) y *E. coli* DH5α (control negativo). Tomado de Gama, 2015.

5.3 Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* fue nombrado por Trevisan en honor al microbiólogo Edwin Klebs en 1885. Es una proteobacteria que se caracteriza por ser Gram-negativa, inmóvil y anaerobia facultativa, la cual es ubicua en la

naturaleza, esto quiere decir que puede habitar en diversos ambientes, como en el agua, suelo, plantas, mucosa de mamíferos. Son organismos saprófitos y puede llegar a formar parte de la flora normal en los seres humanos, en la mucosa del tracto digestivo y nasofaringe, son capaces de fijar nitrógeno. (Arenas *et al.*, 2009).

Dentro de este género se destacan diversas especies, siendo *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca* las más descritas, sin embargo, todas presentan características similares dentro de su patogenicidad, tales como las exotoxinas, cápsula, adhesinas, lipopolisacáridos (LPS), hemolisinas y los sideróforos. Se han encontrado especies de *Klebsiella* conteniendo diversos genes que les confieren resistencia a antibióticos beta-lactámicos, lo que la ha convertido en uno de los centros de atención importantes dentro del área de salud pública, dando como resultado, un mayor número de estudios en diversas especies dentro de este género, principalmente en la obtención de la secuencia de los genomas. Ya que actualmente se cuentan con una variedad de genomas perteneciente a este género, depositados en la base de datos del GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabla 5)

Tabla 5.
Genomas depositados en la base de datos del GeneBank pertenecientes al género Klebsiella

<i>Klebsiella</i> sp.	% GC	Genomas completos	Scaffolds	Contigs
<i>K. pneumoniae</i>	49.7-60.5	62	694	441
<i>K. oxytoca</i>	49.4-58.2	9	97	23
<i>K. variicola</i>	56.6- 58	4	6	13
<i>K. quasipneumoniae</i>	57.4-58.2	1		7

6. JUSTIFICACIÓN

La coccidiosis es una enfermedad de importancia económica dentro de la producción de aves, que es utilizada para consumo humano, debido a que reduce la producción de carne, por lo que se han implementado diversos métodos para su control, como el consumo de drogas, vacunas vivas o atenuadas, sin embargo, ninguno de éstos es completamente satisfactorio, debido a esto, existe una gran demanda por el desarrollo de nuevos productos anticoccidiales que permitan mantener el control de dicha enfermedad sin incrementar sus costos, en la actualidad se han realizado investigaciones utilizando alternativas naturales, como extractos herbales y aceites esenciales, que han probado tener efectos en el control de la coccidiosis, y algunos son utilizados como suplementos alimenticios pero aún se desconoce el origen de su actividad o el mecanismo de acción de alguno de ellos y la dosis que debe ser administrada, además de que la producción de los aceites esenciales

generan grandes costos, por ello es necesario el desarrollo de un anticoccidial que permita un mejor control de esta enfermedad evitando efectos secundarios en el ave o en el consumidor, que sea de origen natural y que su producción se realice a bajos costos, es por eso que en este proyecto se pretende identificar la molécula o las moléculas, que le proporciona la actividad anticoccidiana a la cepa *Klebsiella sp*, y proponer el modo de acción de estas moléculas en contra de la integridad de los ooquistes haciendo uso de las herramientas genómicas.

7. HIPÓTESIS.

A partir del análisis en la anotación funcional del genoma de *Klebsiella sp*. es posible identificar los genes involucrados en la actividad anticoccidiana.

8. Objetivo general

- Identificar los genes que le confieren actividad anticoccidiana a *Klebsiella sp*.

8.1 Objetivos particulares

- Ensamblar y anotar el genoma de *Klebsiella sp*.
- Identificar molecularmente la especie a la que pertenece la cepa *Klebsiella sp*, mediante secuencias concatenadas.
- Determinar los genes involucrados en la actividad anticoccidiana. dentro del genoma de *Klebsiella sp*.
- Proponer el mecanismo de acción de las biomoléculas candidatas involucradas en actividad contra ooquistes

A partir de lo anterior, se planteó la siguiente metodología a seguir, para cumplir con los objetivos planteados.

9. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

9.1 Mantenimiento de la cepa *Klebsiella* sp

La cepa de *Klebsiella* sp. fue tomada del glicerol y sembrada en cajas Petri con agar LB, incubadas a 37º C por 12 hrs y mantenidas a -4 ºC para su uso y preservación por periodos cortos.

9.2 Secuenciación del genoma de *Klebsiella* sp.

A partir de un cultivo de la cepa *Klebsiella* sp. se realizó una extracción y purificación de DNA, utilizando el Kit de extracción Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH), una vez obtenido se efectuó la secuenciación del genoma en la Universidad de Arizona (UA), mediante la plataforma HiSeq de la marca Illumina, por medio de una secuenciación tipo Paired-End (lecturas dobles o pareadas), es decir, lecturas en dirección 5´-3´ y 3´-5´, de un mismo fragmento.

9.3 Ensamble del genoma de *Klebsiella* sp

Se realizó el ensamble del genoma con ayuda de los programas SPAdes versión 3.8.1 y Velvet versión 1.2.10, contenidos en un servidor virtual, una vez obtenidos los ensamblados se efectuó una comparación para elegir el ensamble con un número menor de contigs y la longitud de N50 cercana al 50% del total de la longitud del genoma.

9.4 Anotación del genoma de *Klebsiella* sp

La anotación se realizó mediante el programa RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) versión 2.0 (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), que es frecuentemente utilizado para realizar anotaciones de genomas bacterianos de manera rápida, mediante la predicción de los marcos de lectura abierta (ORF's) utilizando la base de datos de NMPDR (www.nmpdr.org), arrojó como resultado un listado de la función de cada uno de éstos.

9.5 Análisis filogenético con marcadores moleculares

A partir de la anotación, se utilizó las secuencias de marcadores moleculares que se han reportado para identificar a nivel especie cepas bacterianas del género *Klebsiella*, y se realizó una búsqueda de las mismas secuencias contenidas en diferentes genomas bacterianos pertenecientes al género, por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dentro de la base de datos del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), una vez obtenidas las secuencias de interés, se concatenaron y alinearon para la construcción de un árbol filogenético mediante el programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Análisis).

9.6 Curva de crecimiento

Se inocularon en 100 ml de medio LB líquido cada una de las cepas de estudio, llegando a una DO de 0.001, a 600 nm, los cultivos se incubaron a una temperatura de 37°C y 250 rpm. Se calculó el crecimiento celular mediante la lectura de la densidad óptica cada hora durante 55 horas con ayuda de un espectrofotómetro.

9.7 Obtención del extracto intracelular

A partir de un cultivo fresco de cada una de las cepas se obtuvieron 50 mil y se centrifugaron a 15000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se disolvió el *pellet* en 5 ml de PBS (de sus siglas en inglés Phosphate-buffered saline), la ruptura celular se realizó por sonicación con 6 ciclos cada uno de ellos, 20 segundos on y 40 segundos off, a 12 W, con una amplitud del 100%. Se centrifugó a 15000 rpm y se colectó el sobrenadante, se realizó la cuantificación de proteína mediante la curva de Bradford (Bradford, 1976) se utilizó una concentración de 50 µg/ml de proteína para efectuar los bioensayos.

9.8 Tratamiento con tripsina

Una vez obtenido el extracto intracelular, se procedió a realizar una digestión con tripsina, utilizando una concentración de 1:50 en relación tripsina-proteína, se incubó a 37°C durante 2 horas con una oscilación de 250 rpm, al finalizar la incubación se adicionó PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*) en una concentración de 1 Mm, con el fin de inactivar la actividad proteolítica de la enzima. Se utilizó una concentración de 50 µg/ml para realizar los bioensayos.

9.9 Análisis de la actividad anticoccidiana

Se realizaron bioensayos usando un aproximado de 1×10^5 ooquistes integros obtenidos de la vacuna AUTOCOX (Elaborado en México, por Eimeria S.A de C.V.), y se incubaron con las diferentes condiciones del cultivo celular, este procedimiento se realizó en condiciones estériles, se llevaron a cabo

conteos de los ooquistes íntegros, es decir, aquellos que no presenten alteración alguna en las paredes, mediante un hematocitometro o cámara de Neubauer, a las 0, 24 y 48 horas de incubación, y a partir de los datos obtenidos se graficó los ooquistes íntegros observados en cada bioensayo.

9.10 Búsqueda de los genes involucrados

Una vez obtenido la anotación se realizó la búsqueda de los genes que podrían estar relacionados con la actividad anticoccidiana en *Klebsiella*. Se usaron los siguientes criterios: palabra clave o descripción funcional del gen en base a la anotación y homología en la secuencia o dominio de moléculas que lleguen a tener alguna actividad que pueda alterar la viabilidad de los componentes de la pared ooquistica (Tabla 6).

Tabla 6. Características que se tomarán en cuenta para la búsqueda de los genes con actividad anticoccidiana contenidos en *Krebsiella sp.*

Criterio	Ejemplos	Justificación	Modo de acción
Palabra clave	Lipasas Proteasas Porinas Hidrolasas	Pueden atacar las paredes del ooquiste debido a que presentan proteínas, lípidos y en menor proporción glúcidos	Degradan o desnaturalizan proteínas, lípidos y glúcidos que se encuentran en la pared o membrana de los microorganismos. Las porinas secretadas por bacterias Gram negativas realizan poros en las membranas provocando osmosis ¹
Secuencia Homologa	Secuencias hipotéticas y putativas	Las secuencias que resultan con una función putativa o hipotéticas después de una anotación funcional pueden llegar a contener homología con algunas de las moléculas de interés	Al presentar una homología con alguna de las moléculas que contengan las características deseadas (proteasa, lipasas, hidrolasa), esta podría llegar a realizar la misma función ¹
Dominio catalítico	Estructuras homologas a dominios catalíticos que presenten actividades similares a las moléculas de interés	Existen dominios que presentan homología estructural sin embargo no contienen ninguna similitud en su secuencia de aminoácidos, sin embargo, realizan mismas funciones	Los dominios con estructura homologa a las moléculas con características de interés pueden estar realizando la misma función interviniendo en la actividad anticoccidiana ¹

Notas:

1.- Tomado de <https://pfam.xfam.org/>

9.11 Corroboración de la actividad contra ooquistes en los genes candidatos

Se utilizaron inhibidores para determinar el modo de acción de la o las moléculas involucradas, las muestras del extracto intracelular fueron incubadas, independientemente, con el coctel de inhibidores de proteasas M22, que contiene AEBSF, Aprotinin, E-64, Bestatin, Leupeptin y EDTA, con

EDTA y EGTA. Se realizaron bioensayos con cada una de las muestras tratadas con los inhibidores por separado.

10. RESULTADOS

10.1 Secuenciación del genoma de *Klebsiella* sp.

La secuenciación del genoma de *Klebsiella* sp. arrojó lecturas con una longitud de 300 pb, en un total de 1 752,596 de lecturas, contenidas en dos archivos llamados cada uno R1 y R2 que pertenecen a las lecturas en dirección 5'-3' y 3'-5', respectivamente. Con ayuda del programa FasQC se observó la calidad de las secuencias en ambos archivos. Las gráficas de la figura 4 muestran el promedio de las secuencias (línea azul) con una calidad alta en un 83% (posición 1-250 pb) del total de la longitud en la secuencia, al final de la secuencia un 13% (posición 250-290 pb) cuenta con una calidad media, y solo el 4% de la longitud (posición 290-300 pb) cuentan con una calidad baja. La gráfica de la figura 5 muestra la distribución teórica predicha por el programa (línea roja) y la distribución real (línea azul) dada por las lecturas del genoma, el resultado fue de un 55.8 % en contenido de GC en el genoma de *Klebsiella* sp, y se corroboró la ausencia de contaminación en la secuenciación debido a que no presenta hombros en la distribución.

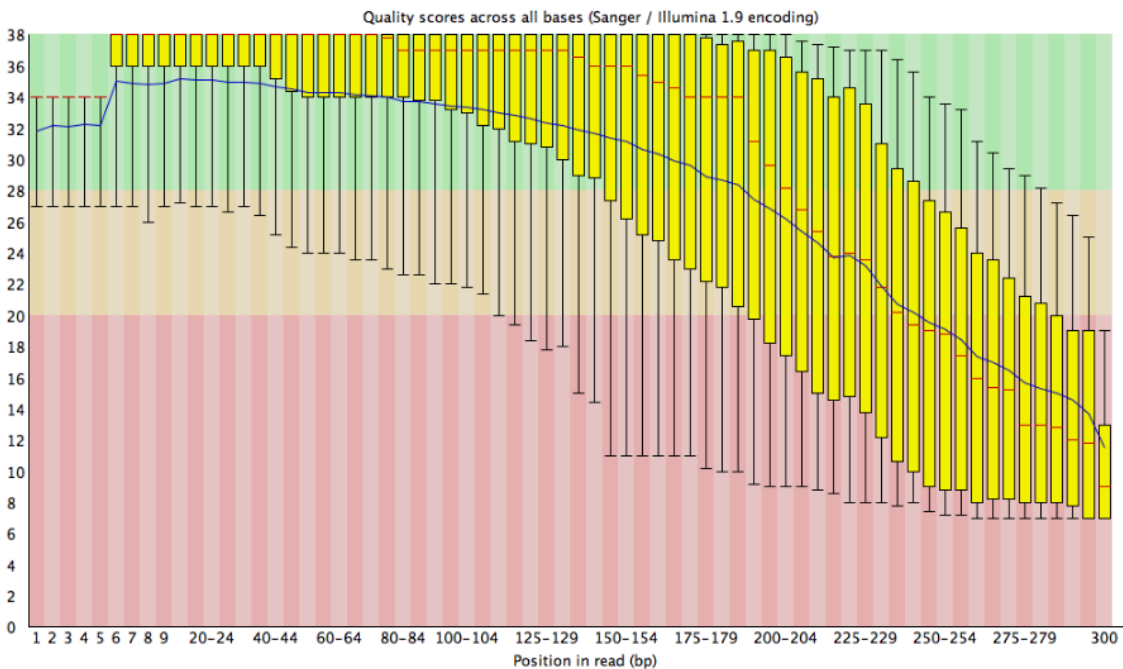
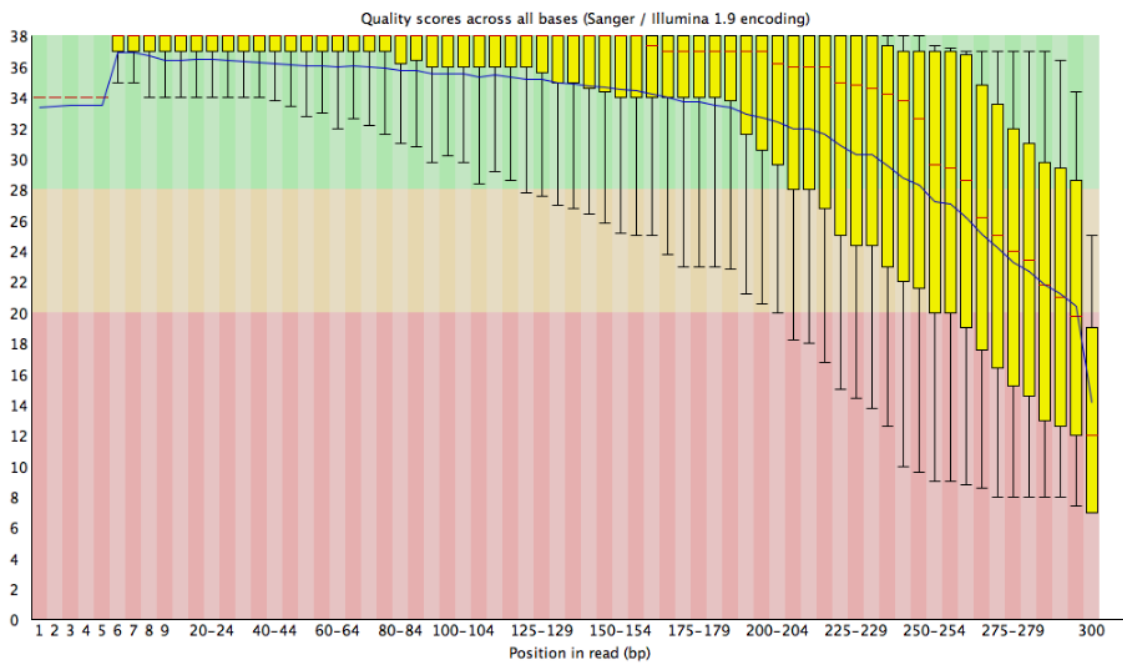


Figura 4. Evaluación de la calidad en las secuencias realizado por el programa FastQC, que divide la calidad en tres niveles alta (región verde) media (región beige) y baja (región roja). A) Calidad de las secuencias del archivo R1 que fue leído en dirección 3'-5'. B) Calidad de las secuencias del archivo R2 que fue leído en dirección 5'-3'.

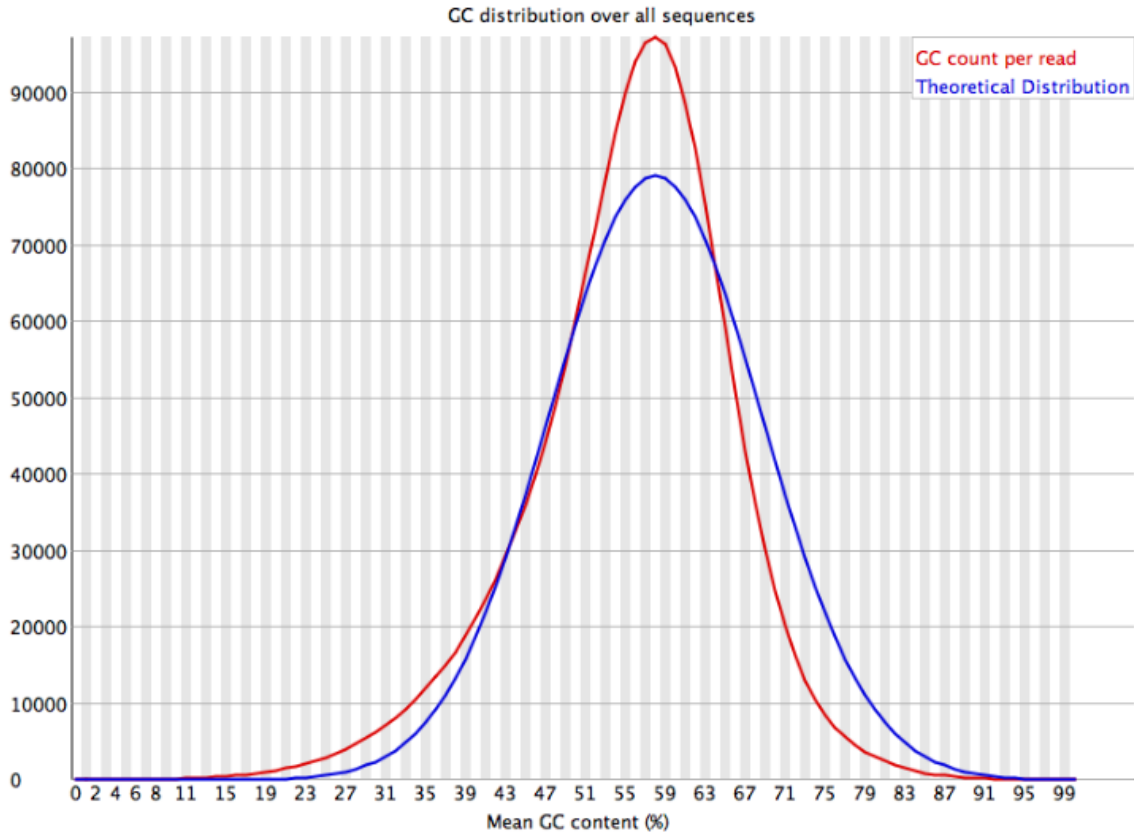


Figura 5. Gráfica del porcentaje de GC, la línea azul corresponde a la distribución teórica predicha por el programa FasQC y la línea roja corresponde a la distribución real del porcentaje contenido en el genoma de *Klebsiella* sp .

Con ayuda del programa *Dynammictrim* se editaron las secuencias de ambos archivos para eliminar el 4% de los pares de bases que tuvieron una calidad baja, nuevamente se realizó la evaluación de la calidad (Figura 6) observándose que en promedio (línea azul) el 100% de la longitud de las secuencias ahora contenía una calidad alta, a partir de esto se procedió a realizar el ensamble del genoma.

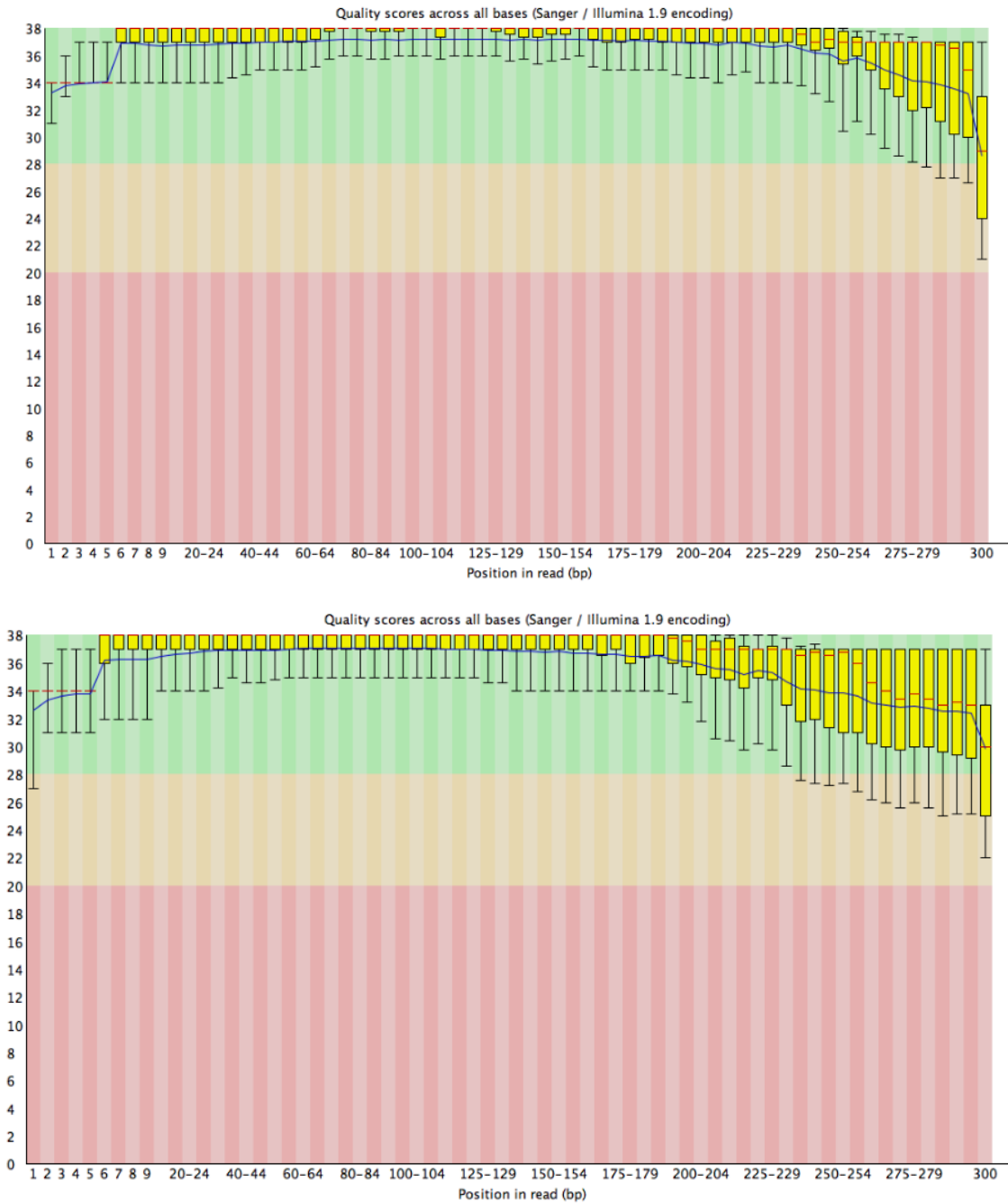


Figura 6. Gráfica de la calidad de las secuencias editadas con el programa *Dynammictrim* A) calidad de las secuencias del archivo R1 que fue leído en dirección 3'-5'. B) Calidad de las secuencias del archivo R2 que fue leído en dirección 5'-3'.

10.2 Ensamble del genoma de *Klebsiella* sp.

El ensamblaje se realizó con los programas Velvet y SPAades, una vez obtenido los datos, se realizó una depuración de los contigs que contuvieran

un número menor a 500 pb, a partir de esto se llevó a cabo una comparación entre los ensamblajes con y sin depuración para poder elegir el que contuviera un menor número de contigs y una longitud de N50 mayor, ya que, este dato indica la longitud del contig más pequeño dentro del grupo que representa el 50% de la longitud total del genoma. Con el programa Velvet se obtuvo una diferencia de 20 contigs menos entre el ensamblaje sin y con depuración, los cuales contenían un aproximado de 10,946 pb en total y una N50 de 227,063 pb en ambos ensamblajes. El programa SPAdes produjo una diferencia de 131 contigs entre los ensamblajes sin y con depuración, que contenían un aproximado de 173,098 pb, y una N50 de 795,564 pb en ambos casos (Tabla 7). Tomando en cuenta lo anterior, se tomó la decisión de trabajar con el ensamblaje producido por el programa SPAdes con la depuración de contigs menores a 500 pares de bases, ya que la N50 no presentó modificación y el número de contigs se redujo considerablemente pasando de 165 a 34 en total.

Tabla 7. Características del ensamble del genoma con y sin el depurado de contigs

Estado	Velvet		SPAdes	
	No depurado	Depurado	No depurado	Depurado
Contings	74	54	165	34
Longitud (pb)	5,895,630	5,884,684	5,955,898	5,892,800
Contenido de GC (%)	55.8	55.8	55.8	55.8
N50	227063	227063	795564	795564

10.3 Anotación del genoma de *Klebsiella* sp

La anotación se realizó mediante la predicción de marcos de lectura abiertos por medio del servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) versión 2.0 (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), el cual es utilizado para el ensamble de genomas de organismos procariotas. Este realiza una comparación a partir de sistemas y subsistemas de datos de familias de proteínas, así como de otras secuencias de genes encontrados. El servidor realizó la predicción de la función de cada uno de los marcos de lectura abierta (ORF's) que se encontraron en los contigs, dando en total 5578 secuencias codificantes dentro de genoma de *Klebsiella* sp. Mediante el programa

ARAGORN (<https://omictools.com/aragorn-tool>) se pudieron predecir 79 RNA de transferencia y el servidor RNAmmer (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer>) predijo un gen que codifica para el 23s, un gen que codifica para el 16s y ocho genes que codifican para el 5s (Tabla 8).

Tabla 8. Características de la anotación del genoma de *Klebsiella sp.*

SPAdes		Estado	Editado
		CDS	5578
		tRNA	79
		rRNA	10
		5s	8
rRNA		23s	1
		16s	1

Abreviaturas. **CDS**: secuencias codificantes, **tRNA**: ácido ribonucleico de transferencia, **rRNA**: ácido ribonucleico ribosomal

10.4 Identificación molecular de *Klebsiella sp.*

Una vez obtenido el ensamble del genoma de *Klebsiella sp.* se realizó una comparación filogenética para estudiar la relación que guarda con otros microorganismos del mismo género y poder clasificarla dentro de una especie, para lo cual se hizo una búsqueda en la literatura, de los genes reportados para la identificación a nivel especie dentro del género de *Klebsiella*, dando como

resultado los genes *gyrA* (subunidad α de la DNA girase), *rpoB* (subunidad β de la RNA polimerasa) (Brisse *et al.*, 2014, Brisse y Verhoef, 2001), *mdh* (malato deshidrogenasa), *parC* (subunidad IV de la DNA topoisomerasa) y el gen 16s (Rosenblueth y Martínez, 2004). Las secuencias de estos fueron obtenidas a partir de la base de datos del NCBI (por sus siglas del inglés National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), además se incluyeron las secuencias de dos cepas otorgadas por el laboratorio de Biología Molecular de Plantas (KpMx-1 y KvMx-2, descritas posteriormente) pertenecientes al género de *Klebsiella*. Las secuencias se concatenaron y posteriormente se alinearon con el programa MEGA 7.0 por medio de la herramienta Muscle, una vez obtenido el alineamiento se realizó una filogenia con el algoritmo neighbour-joining con un bootstrap de 1000 repeticiones. El árbol filogenético dio como resultado tres clados que agrupan claramente las especies de *K. pneumoniae*, *K. variicola* y *K. oxytoca*, la cepa utilizada para este estudio fue filogenéticamente agrupada dentro del clado de *K. oxytoca*, y se procedió a nombrarla Kox Ac. Las cepas, anteriormente mencionadas, pertenecientes a la especie de *K. pneumoniae* (KpMx-1) y *K. variicola* (KvMx-2) fueron agrupadas en los clados correspondientes su especie (Figura 7).

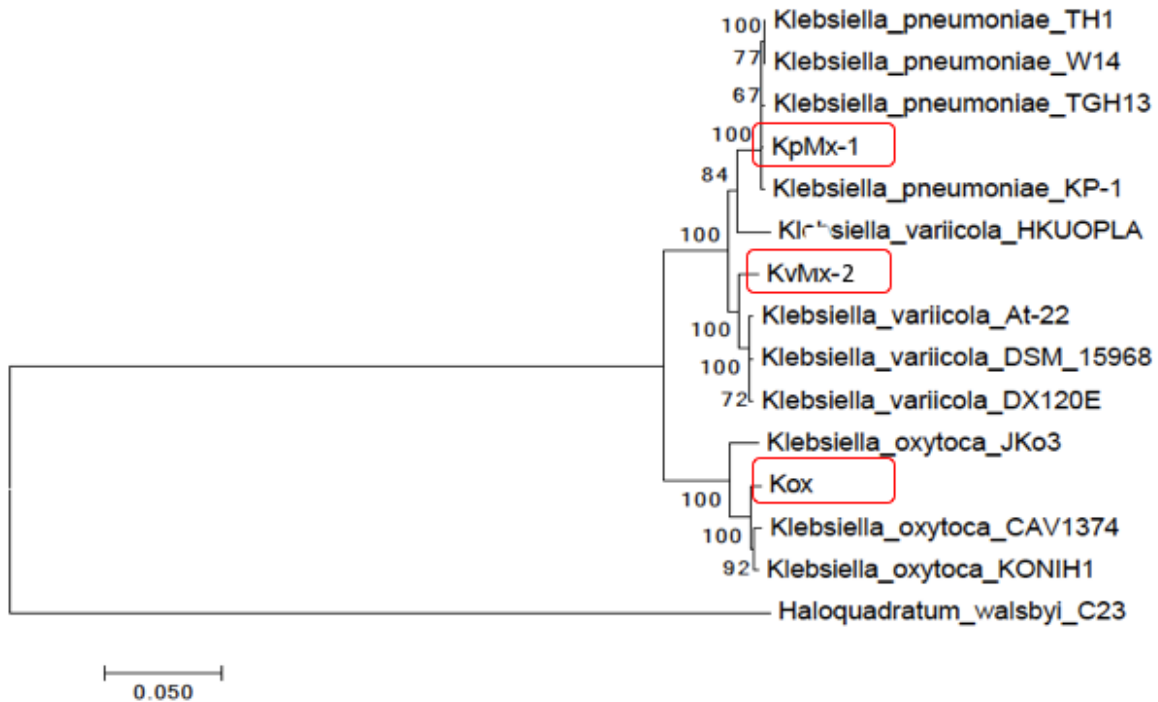


Figura 7. Análisis filogenético realizado con secuencias concatenadas con los genes *gyrA*, *mdh*, *parC*, *rpoB* y *16s*, pertenecientes a diversas especies del género *Klebsiella*, se utilizó el algoritmo neighbour-joining con un bootstrap de 1000 repeticiones.

10.5 Curvas de crecimiento

Se llevó a cabo una cinética de crecimiento de las cepas Kox-Ac, KpMx-1 y KvMx-2. A partir de un inóculo con una D.O._{600nm} de 0.01, se realizó la lectura de la absorbancia cada hora durante 55 horas de incubación dando como resultado un crecimiento similar entre las 3 cepas (Figura 8).

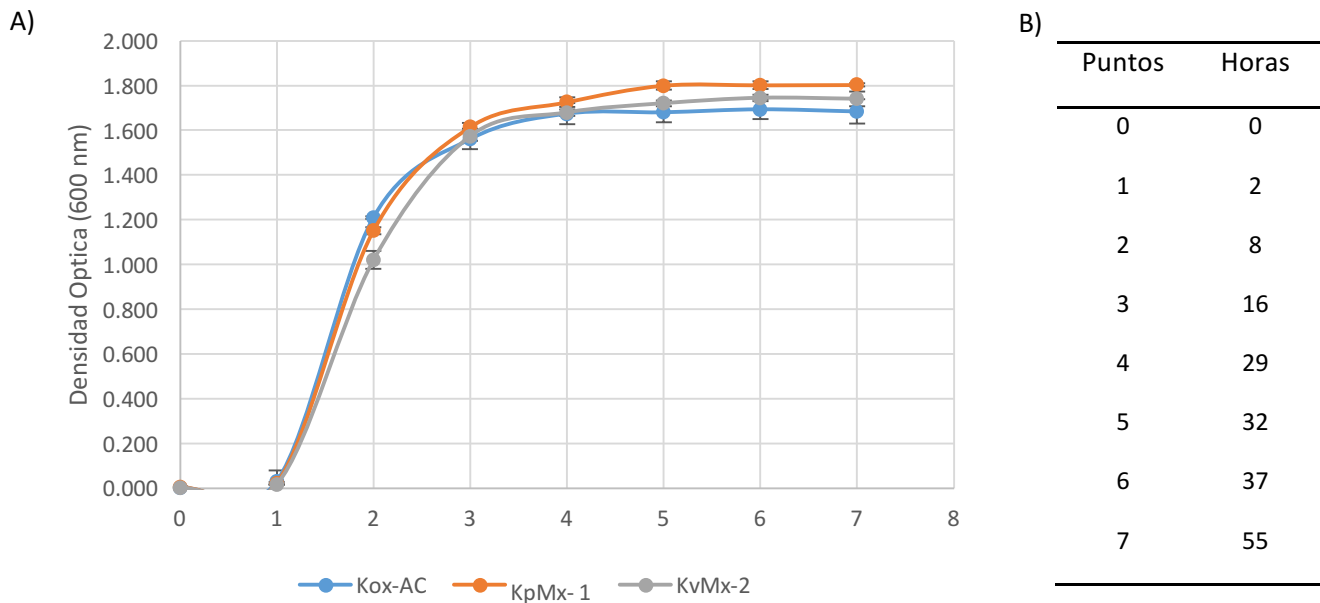


Figura 8. A) Cinética de crecimiento de las cepas Kox-Ac (línea azul), KpMx-1 (línea roja) y KvMx-2 (línea gris) incubadas por 55 horas. B) Escala utilizada para indicar las horas de crecimiento en cada punto de la grafica

Con base en lo anterior se eligieron cuatro tiempos dentro del crecimiento de las cepas para efectuar los bioensayos, a las 12 horas de incubación, que fue el punto donde realizó los bioensayos Gama en 2015, a las 4, 6 y 9 horas de incubación que marcan diferentes etapas del crecimiento, con el fin de observar el comportamiento de la actividad (Figura 8A).

10.6 Análisis de la actividad anticoccidiana en las cepas KpMx-1(*K. pneumoniae*) y KvMx -2 (*K. variicola*)

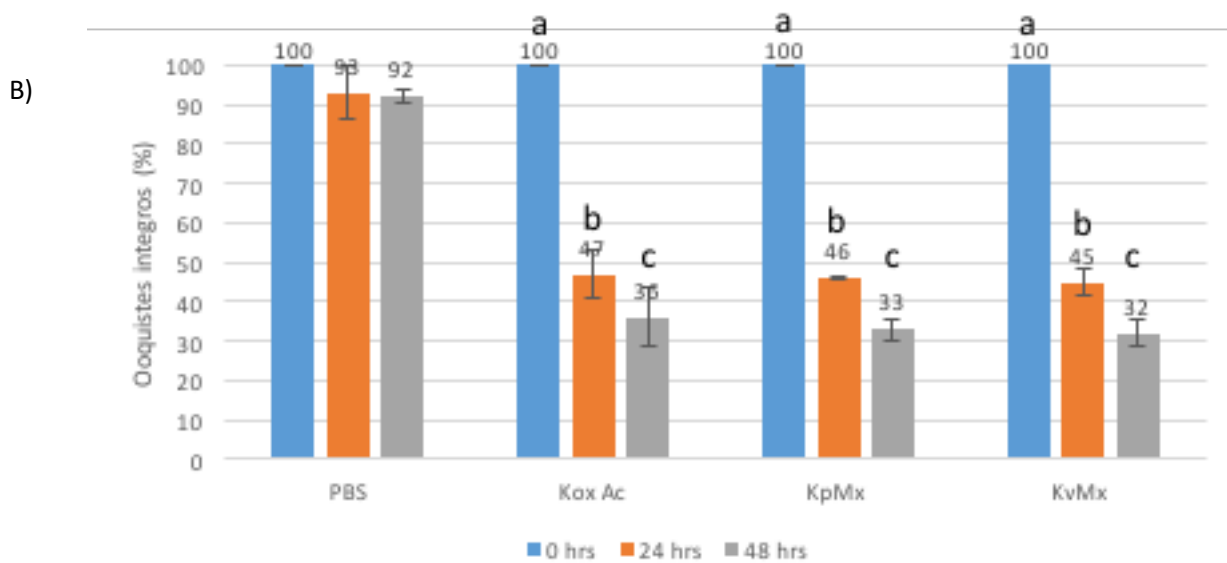
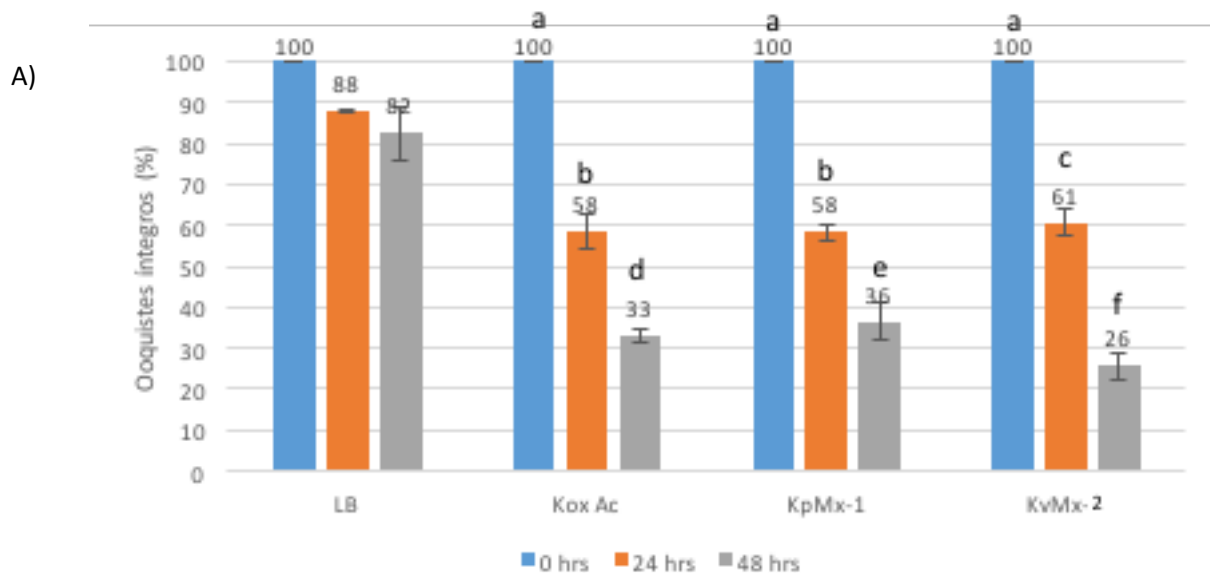
Se llevó a cabo la búsqueda de cepas pertenecientes al género *Klebsiella*, para observar el comportamiento de estas en la incubación con los ooquistes, dichas cepas tendrían que contar con el genoma secuenciado, esto con la intención de obtener una cepa que no afectara la integridad de las paredes

ooquistas, la cual podría seleccionarse como control negativo, y así realizar una comparación genómica para obtener aquello que no se comparte entre ambas y buscar dentro de estas secuencias no compartidas del genoma de Kox-Ac los genes candidatos que pudieran estar involucrados.

Como se mencionó previamente se obtuvieron dos cepas clasificadas como *Klebsiella variicola* (KvMx-2) y *Klebsiella pneumoniae* (KpMx-1), proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, en el Centro de Investigaciones en Biotecnología (CeIB), UAEM, aisladas en el municipio de Cuautla Mor. a partir de un cultivo de caña de azúcar.

Las cepas fueron sometidas a bioensayos, usando el cultivo completo, el *pellet* celular y el sobrenadante del cultivo de manera independiente obtenidos a las 12 horas de incubación. Sorpresivamente se observó que éstas también presentaban una actividad en contra de la integridad de las paredes ooquistas, además de que los porcentajes de reducción de ooquistes íntegros eran muy similares con los obtenidos por la cepa Kox Ac, para determinar si la actividad de las tres cepas era similar, se realizó una prueba bioestadística de ANOVA donde se encontró que presentan una diferencia significativa ($F_{(2,6)}=9.635$, $p=0.0134$) y KvMx-2 presenta una actividad mayor a Kox-Ac y KpMx-1 a las 48 horas del bioensayo (Figura 9A). Sin embargo, al separar los componentes del cultivo, es decir, en los bioensayos realizados con el *pellet* celular ($F_{(2,6)}=1.064$, $p=0.4021$) y el sobrenadante ($F_{(2,6)}=3.296$, $p=0.1082$) por separado no se encontró diferencia significativa (Figura 9B, 9C). Con base en lo anterior, se decidió incluirlas en el estudio, esto con el fin de realizar una comparación

genómica de lo que están compartiendo y llevar a cabo una búsqueda de los genes que pudieran estar involucrados en la actividad.



c)

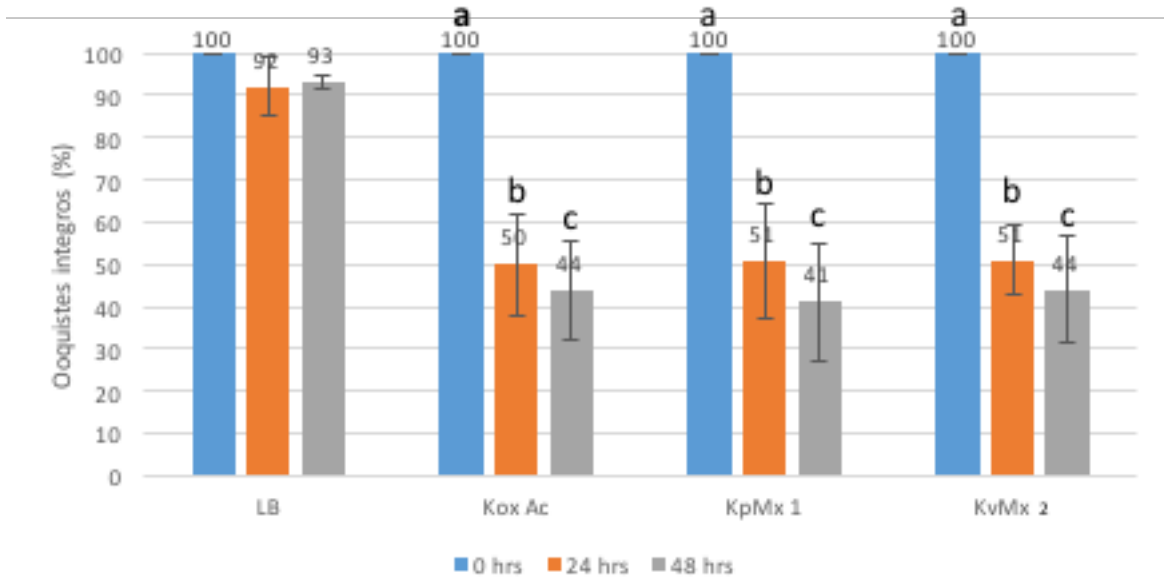


Figura 9. Porcentaje de los ooquistes íntegros obtenidos en los conteos realizados a las 0, 24 y 48 horas del bioensayo incubado con las cepas KpMx-1 y KvMx-2, pertenecientes a *K. pneumoniae* y *K. variicola* respectivamente, se utiliza la cepa Kox-Ac perteneciente a *K. oxytoca* como control positivo y LB o PBS como control negativo. A) Bioensayos realizados con el cultivo completo incubado durante 12 horas y tomado a una DO_{600nm} de 1.4. B) Bioensayos realizados con *pellet* celular tomado a partir de un cultivo incubado por 12 horas con una DO_{600nm} de 1.4, C) Bioensayos realizados con el sobrenadante obtenido del cultivo celular previamente incubado por 12 horas. Las letras sobre las barras indican los grupos que no presentan diferencia significativa, y las líneas horizontales representan la desviación estándar entre tres repeticiones.

10.7 Bioensayos con *pellet* celular en los tiempos de crecimiento seleccionados

Se realizaron los bioensayos usando el *pellet* celular de los cultivos de Kox-Ac, KpMx-1 y KvMx-2 a las 4, 6 y 9 horas de incubación (Figura 10). Los resultados fueron agrupados por cepa. El *pellet* celular de Kox-Ac presento

mayor actividad cuando fue tomado a las 4 horas de incubación, a partir de un ANOVA se observó que los tres tiempos presentaron una diferencia significativa ($F_{(2,6)}=163.9, p<0.0001$) además se observa que cuando el tiempo de incubación aumenta el número de ooquistes íntegros es mayor, es decir, disminuye la actividad. El *pellet* de la cepa KpMx-1 presento mayor actividad a las 4 y 6 horas de incubación, sin embargo, al aumentar el tiempo de crecimiento, se observa un aumento con una diferencia significativa ($F_{(2,6)}=7.083, p=0.0264$) en el porcentaje de ooquistes íntegros, nuevamente se vuelve a observar una disminución en la actividad anticoccidiana. El *pellet* de la cepa KvMx-2 presento una actividad similar a las 48 horas del bioensayo en los tres tiempos de crecimiento, mediante el análisis ANOVA se observó que no existe una diferencia significativa ($F_{(2,6)}=2.537, p=0.1590$) en los conteos realizados a las 48 horas del bioensayo entre los tres tiempos de incubación. Con base en los datos obtenidos, se observa que las tres cepas presentan diferencias en cada uno de los tiempos de incubación.

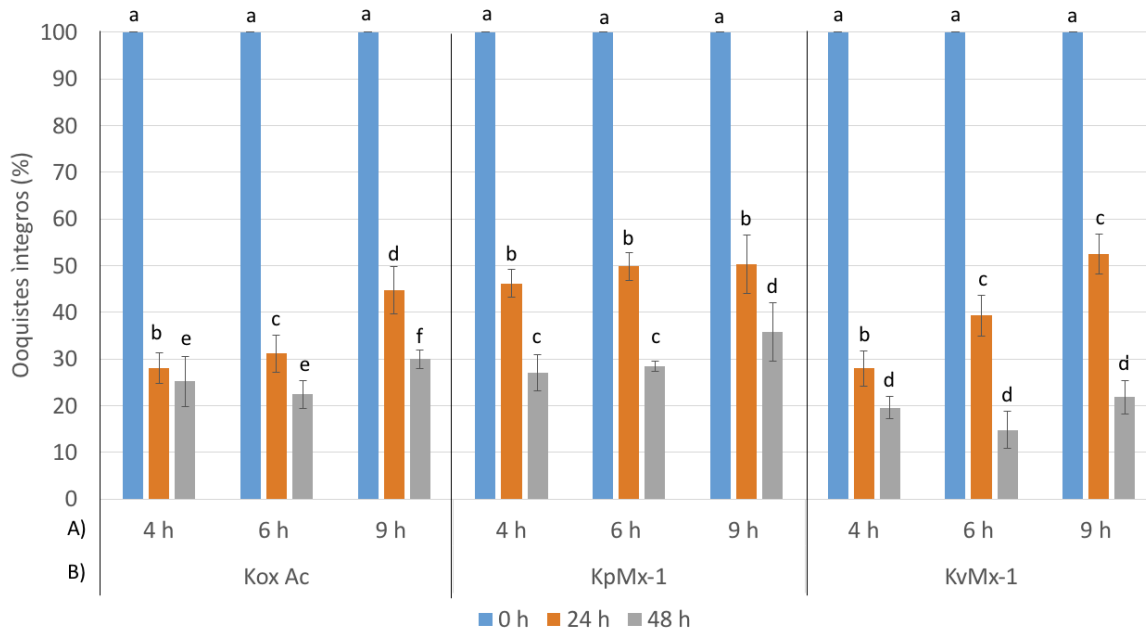


Figura 10. Ooquistes íntegros obtenidos en los conteos a las 0, 24 y 48 horas del Bioensayos realizados con el *pellet* celular del cultivo tomado en diferentes tiempos de incubación. Las letras sobre las barras indican los grupos que no presentan diferencia significativa, y las líneas horizontales representan la desviación estándar entre tres repeticiones.

10.8 Bioensayos realizados con el sobrenadante del cultivo en los tiempos seleccionados

Los bioensayos realizados con el sobrenadante de los cultivos obtenidos a las 4, 6, 9 horas, nuevamente se agrupan por cepa (Figura 11). El sobrenadante de la cepa Kox-Ac mantiene una actividad sin diferencia significativa ($F_{(2,6)}=1.99$, $p=0.2173$) a las 48 horas del bioensayo. El sobrenadante de la cepa KpMx-1 presenta mayor actividad a las 48 horas del bioensayo, no obstante, se observa una disminución de la actividad a las 9 horas de incubación. El sobrenadante de la cepa KvMx-2 presenta una mayor actividad a las 4 y 9 horas de incubación, en cambio a las 6 horas esta actividad se ve disminuida al aumentar el número de oocistas íntegros. Al igual que en los bioensayos realizados con el *pellet* celular, se observó diferencias en la

actividad del sobrenadante de las tres cepas en las diferentes horas de incubación.

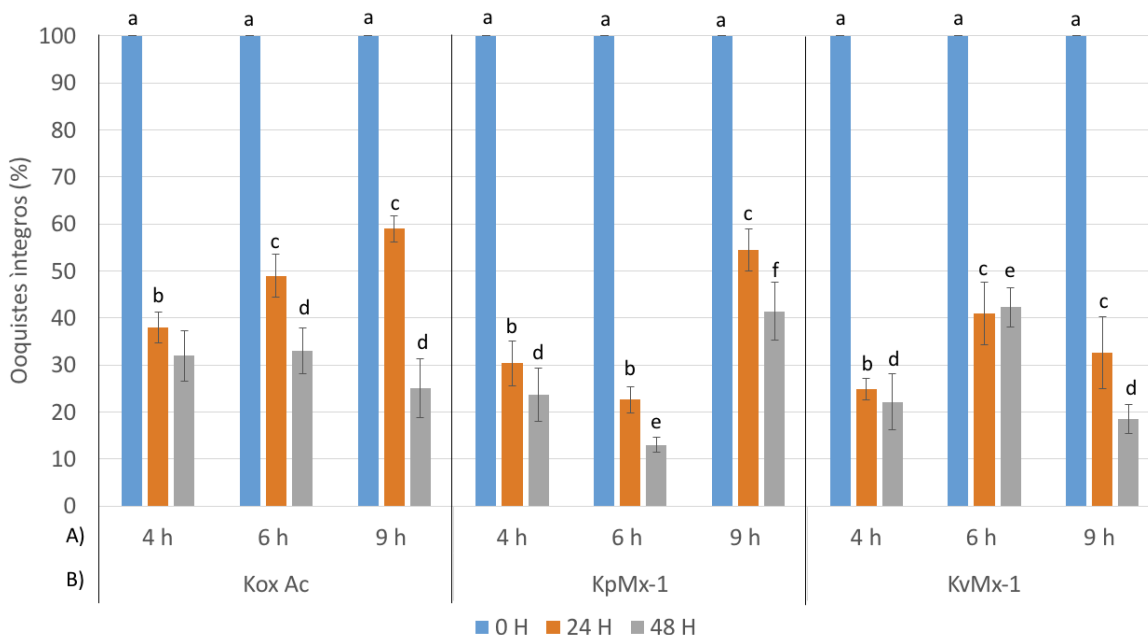


Figura 11. Ooquistes integros observados a las 0, 24 y 48 horas en los bioensayos realizados con el sobrenadante del cultivo tomado a las 4, 6 y 9 horas de incubación a 37°C. Las letras sobre las barras indican los grupos que no presentan diferencia significativa, y las líneas horizontales representan la desviación estándar entre tres repeticiones.

10.9 Bioensayos con proteína

Los bioensayos realizados con el extracto intracelular, obtenido a las 12 horas de incubación, dieron como resultado una actividad similar entre las tres cepas (Figura 12), a partir de un ANOVA se observó que la actividad a las 0, 24 y 48 horas del bioensayo no presentan diferencia significativa ($F_{(2,6)}=0.2553$, $p=0.7827$). Dicho comportamiento es similar al observado en los bioensayos realizados con *pellet* y sobrenadante del cultivo obtenido a la misma hora de incubación, no obstante, los porcentajes de la actividad fueron diferentes, ya

que se presentó una actividad mayor obteniendo un rango de 21-26% de ooquistes íntegros a las 48 horas del bioensayo.

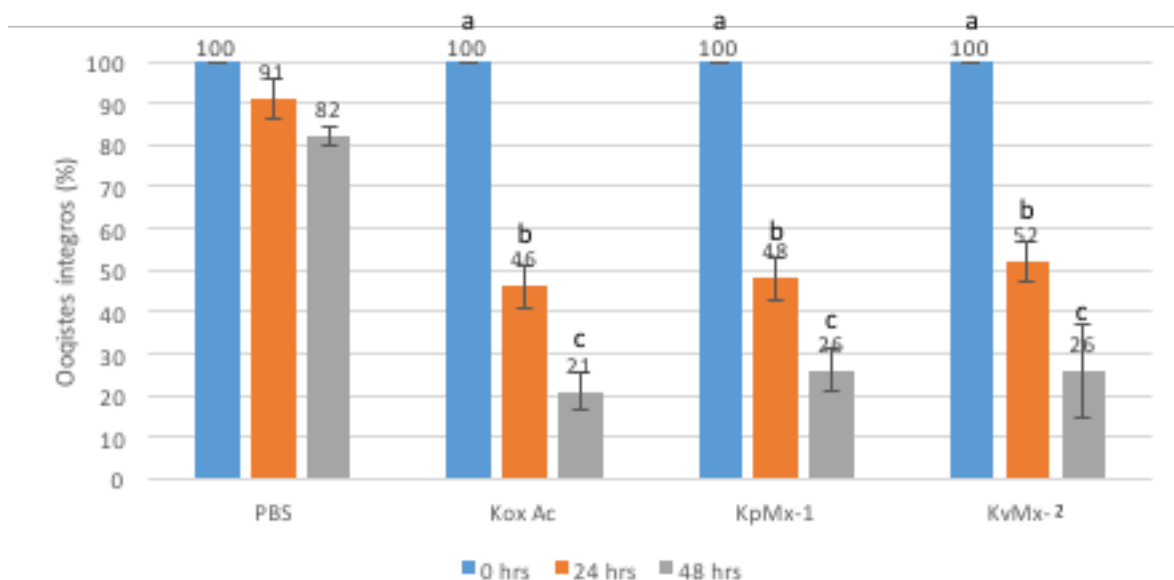


Figura 12. Porcentaje de ooquistes íntegros obtenidos en los conteos a las 0, 24 y 48 horas del bioensayo realizado con el extracto intracelular obtenido a partir de la lisis celular por sonicación de Kox-Ac, KpMx-1 y KbMx-1 incubadas por 12 horas a 37°C, se utilizó un aproximado de 50 µg para cada bioensayo, y el control negativo fue incubado con PBS. Las letras sobre las barras indican los grupos que no presentan diferencia significativa, y las líneas horizontales representan la desviación estándar entre tres repeticiones.

10.10 Bioensayos con el extracto intracelular tratados con tripsina

Se realizó una digestión con tripsina, para degradar las moléculas de origen proteico, se incubaron por 18 horas a 37°C y posteriormente se provocó la inhibición de la proteasa con la adición de PMSF, que es un inhibidor específico para esta proteasa, uniéndose irreversiblemente a la serina que forma parte del sitio activo de dicha proteína, se corroboró la digestión mediante una electroforesis de poliacrilamida (Figura 13).

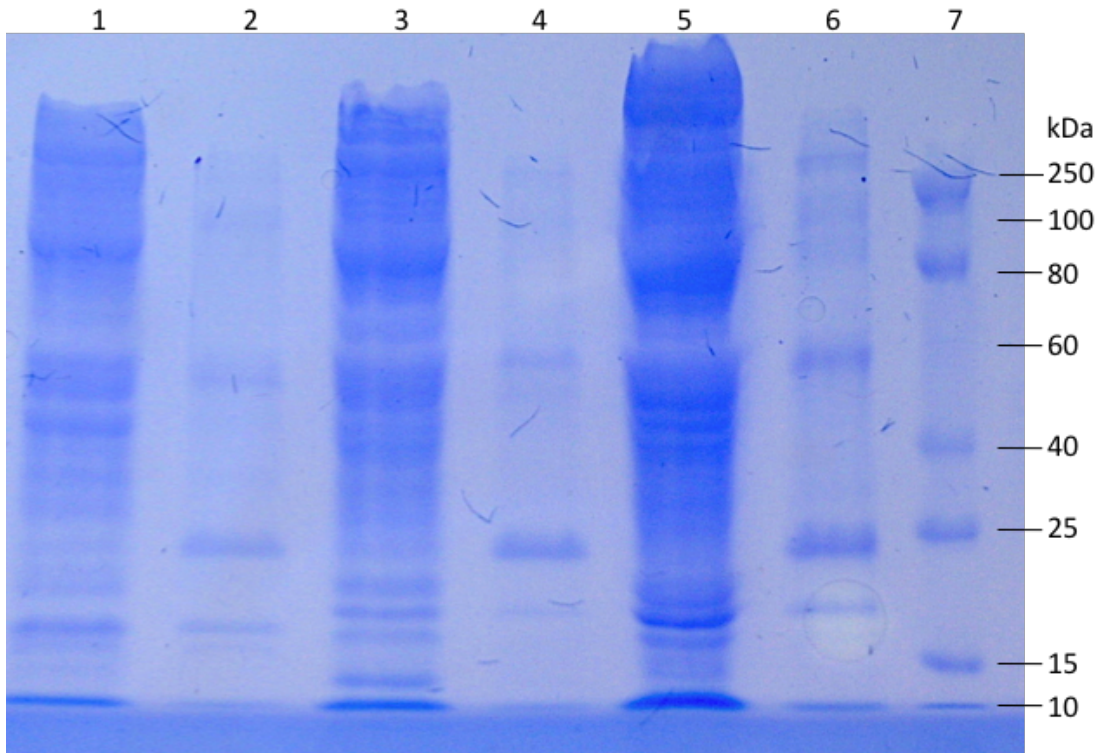


Figura 13. Electroforesis de la digestión con tripsina en las muestras del extracto intracelular de las cepas utilizadas para este estudio. Carril 1: muestra de Kox-Ac sin tratamiento, carril 2: muestra Kox-Ac con proteasa, carril 3: muestra de KpMx-1 sin proteasa, carril 4: muestra de KpMx-1 con proteasa, carril 5: muestra de KvMx-2 sin proteasa, carril 6: muestra de KvMx-2 con proteasa, carril 7: marcador de peso molecular.

Se realizaron bioensayos (Figura 14), en donde se observó una reducción considerable de la actividad, se llevó a cabo un ANOVA donde no se observó diferencia significativa ($F_{(2,6)}2.569, =p=0.1272$) entre los resultados de las tres cepas a las 48 horas del bioensayo con extracto intracelular tratado con tripsina.

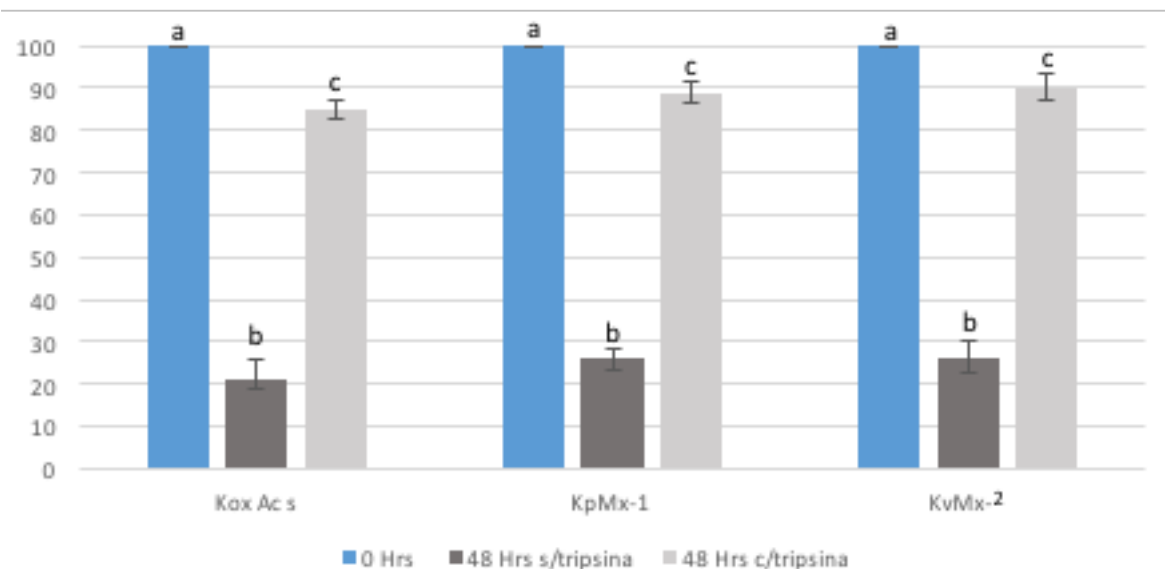


Figura 14. Bioensayos realizados con extracto intracelular tratado con tripsina, se realizaron conteos a las 0 y 48 horas. Se utilizó un total de 1×10^5 ooquistes en cada bioensayo, los valores fueron convertidos en porcentaje para su manejo. Se muestra el % de ooquistes íntegros observados en cada tiempo. Las letras sobre las barras indican los grupos que no presentan diferencia significativa, y las líneas horizontales representan la desviación estándar entre tres repeticiones.

10.11 Búsqueda de los genes candidatos a partir de la anotación de las cepas utilizadas en el estudio

Con base en lo observado en la actividad que presentan las cepas, y la inhibición de la actividad en el tratamiento de tripsina se realizó una comparación por medio de la herramienta bioinformática *Blast all* utilizando las secuencias que codifican para proteínas de las 3 cepas, a partir de esta comparación se obtuvieron 3 agrupaciones de secuencias. En la figura 15 se muestran estos grupos representados por círculos, el externo contiene las secuencias que son únicas para cada cepa, Kox Ac obtuvo el mayor número de secuencias únicas contenidas en el genoma con un número de 587, el círculo intermedio contiene el número de secuencias que comparten entre dos cepas,

KvMx-2 comparte 793 secuencias con KpMx y Kox Ac, y entre estas dos últimas se comparte 509, el círculo interno, contiene las secuencias que son compartidas entre las tres cepas, el cual recibe el nombre de Core, con un número total de 2048 secuencias. se procedió a utilizar este grupo de secuencias compartidas para realizar un análisis de las proteínas que pudieran estar implicadas en dicha actividad, se utilizó la función asignada por la anotación para obtener aquellas moléculas que puedan presentar una acción en contra de la pared ooquística, donde las principales fueron lipasas, proteasas e hidrolasas.

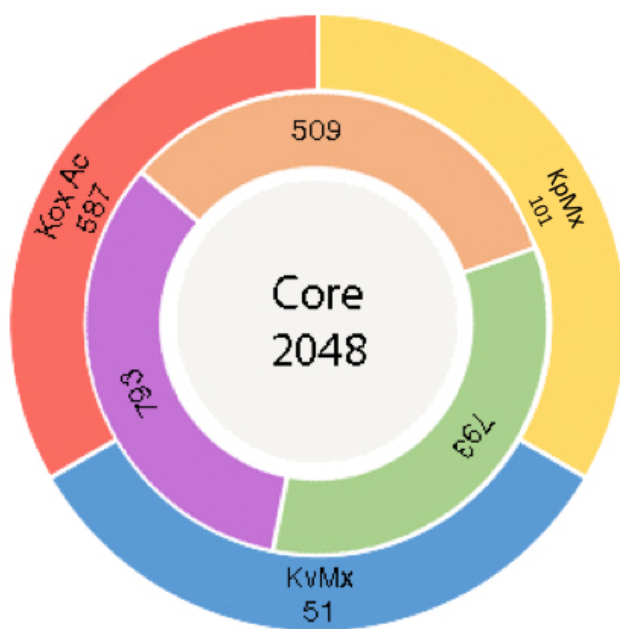


Figura 15. Diagrama de la relación de los genomas de las tres cepas del género de *Klebsiella* utilizadas en el estudio.

Para todas aquellas secuencias que tuvieran una anotación tal como hipotética o putativa, se realizó un análisis del dominio de cada secuencia con ayuda del

servidor en línea Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) de la paquetería de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>). En dicho programa se realizó una búsqueda de homología en la secuencia del dominio, esto con el fin de asignar una acción, se analizó un total de 118 secuencias putativas y 222 hipotéticas, de las que, 32 y 146 respectivamente, no se hayo información. Se obtuvo un total de 1870 secuencias con una función asignada. La búsqueda de los genes candidatos llevo a un total de 12 genes (Tabla 9), entre los cuales se encuentran metaloproteasas, proteasas específicas, quinona oxidoreductasas, fosfolipasas, y lipasas. Estos genes fueron seleccionados en base a la estructura del ooquiste, ya que, por la acción que realizan, pudieran están involucrados en el daño que presentan las paredes oquistales.

Tabla 9. *Genes candidatos identificados a partir del Core de los tres genomas*

	Contig ID	Función	Modo de búsqueda	Modo de acción
	NODE_98	Peptidase U32		Probable peptidase de colágeno tipo 1
	NODE_212	Protease II (EC 3.4.21.83)		Degradación de proteínas
	NODE_106	Quinone oxidoreductase (EC 1.6.5.5)		Reducción de compuestos quinonas
	NODE_10	NADPH:quinone oxidoreductase 2		Reducción de compuestos quinonas
ANOTACIÓN	NODE_10	ILL6; metallopeptidase		Degradación de matriz extracelular
	NODE_121	Lipase, family GDXG	Palabra clave	Degradación de lípidos
	NODE_5346	Aminopeptidase S (Leu, Val, Phe, Tyr preference) (EC 3.4.11.24)		Enzima proteolítica que degrada el residuo N-terminal produciendo péptidos pequeños y aminoácidos libres. Específica para leucina, valina, fenilalanina y tirosina.
	NODE_11	Hemolysin		Enzima formadora de poros, forma una estructura en forma de barril, uniéndose a los lípidos de la membrana de los eritrocitos realiza una función de poro, permitiendo el paso de agua y moléculas pequeñas provocando la lisis de las células
PUTATIVAS	NODE_2	Metaloproteasa Peptidase family M48	Homología en dominio catalítico	Degradación del extremo C terminal en proteínas farnesiladas
	NODE_10	Patatin-like phospholipase		Actividad enzimática de la fosfolipasa, catalizando la escisión de los ácidos grasos de los lípidos de la membrana
HIPOTETICAS	NODE_12	NADPH-dependent FMN reductase	Homología en dominio catalítico	Cataliza la escisión reductora del enlace azoico en compuestos azoicos aromáticos a las aminas correspondientes y NAD (P) H: quinona oxidorreductasa, que reduce las quinonas al estado hidroquinona Para evitar la interacción de la semiquinona con O ₂ y la producción de superóxido
	NODE_1	Tyrosine phosphatase family		Las tirosinas fosfatasa de proteínas son un grupo de enzimas que eliminan los grupos fosfato de los residuos de tirosina fosforilados sobre las proteínas.

10.12 Análisis de la actividad observada en el extracto intracelular tratado con inhibidores de proteasas

A partir del análisis realizado con el conjunto de proteínas compartidas entre las tres cepas, se cuentan con una variedad de proteasas en los genes elegidos como posibles candidatos, es por ello que se decidió utilizar diversos inhibidores de proteasas para observar el comportamiento de la actividad presentada en el extracto intracelular. Se utilizó el cocktail de inhibidores M222.1 ML de la marca AMRESCO, que contiene AEBSF, Aprotinin, E-64, Bestatin, Leupeptin y EDTA, además se realizó una inhibición por separado usando solamente EDTA. El cocktail de inhibidores redujo considerablemente la actividad (Figura 16, barra café) al igual que la inhibición con EDTA (Figura 16, barra verde olivo) en cambio el tratamiento con EGTA no provocó modificación en la actividad ya que el porcentaje obtenido es similar al obtenido con el extracto intracelular sin inhibidores.

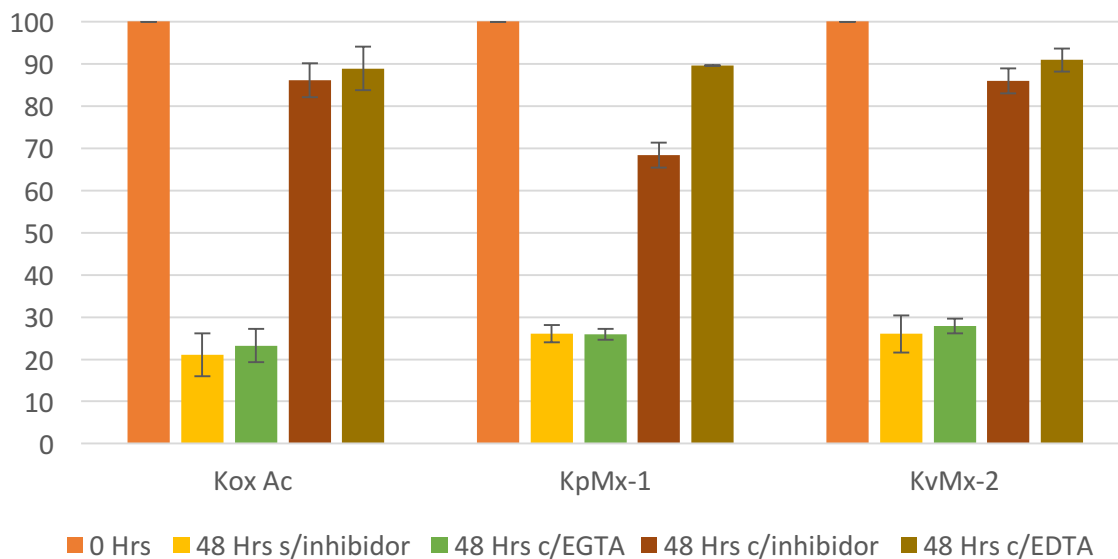


Figura 16. Ooquistes íntegros observados en los bioensayos realizados con el extracto intracelular obtenido a partir de un cultivo incubado por 12 horas a 37°C, tratado con diversos inhibidores de proteasas. Las líneas horizontales representan la desviación estándar entre tres repeticiones.

11. Discusión

El desarrollo de diversas plataformas de secuenciación ha generado la implementación de herramientas bioinformáticas facilitando el manejo de la información que surge a partir de ésta, como es el caso de los programas ensambladores que usan diversos algoritmos para realizar el ensamble de un genoma, sin embargo, no todos los ensambladores han presentado la misma eficiencia, es decir, que permitan obtener un genoma con un menor número de gaps o espacios entre los contigs, esto con el fin de obtener una mejor representación del genoma completo. En 2015 Scott and Ely, realizaron un análisis en el rendimiento de 8 ensambladores utilizando el genoma de *Caulobacter henricii*, donde mostraron que el ensamblador SPAdes, que es utilizado con mayor frecuencia en el ensamble de genomas bacterianos, arroja resultados eficientes al evaluar el tiempo de corrida, número de contigs, valor

de N50, %GC's. En 2014 Abbas y col., realizan una evaluación del rendimiento en los ensambladores SPAdes y Velvet, que son los más utilizados recientemente, con los genomas de 5 hongos diferentes, nuevamente SPAdes presentó el mejor rendimiento al comparar los datos arrojados por el ensamblador Velvet.

En este estudio se realizó el ensamble de *Klebsiella* sp. usando los ensambladores SPAdes y Velvet (Tabla 4), se obtuvo una mayor eficiencia con ensamblador SPAdes, dando como resultado un menor número de contigs y una longitud mayor en la N50. El rendimiento del ensamblador SPAdes puede ser atribuido por la manera en cual este opera, ya que aunque los dos utilizan el mismo algoritmo para realizar el ensamblado, SPAdes permite utilizar un intervalo en el valor de los Kmeros (longitud que utiliza el programa para fragmentar las secuencias) y los analiza de manera seriada, es decir, mejorando el borrador anterior al construir el siguiente, y realiza una comparación entre estos para definir, por el número de contigs y el valor de N50, el ensamble más eficaz, sin embargo Velvet sólo permite introducir un valor de Kmero por ensamble generando un sólo borrador.

La clasificación del género *Klebsiella* se ha basado principalmente en el uso de diversos sustratos, así como sus actividades enzimáticas, pero este método ha generado una confusión que ha prevalecido en la nomenclatura de este género, en 2001 Brisse y Verhoef, proponen el uso de los genes housekeeping *gyrA*, *rpoB* y *parC*, para una identificación entre *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, a partir de una reclasificación de un grupo de 120 cepas adquiridas de diferentes hospitales en Europa. En 2004, Rosenblueth y col. realizaron una clasificación

de 131 cepas clínicas y 8 ambientales usando los genes propuestos por Brisse y Verhoef y los genes *mdh*, *phoE*, *infB* y *nifH*, obteniendo un grupo diferente a *K. pneumoniae*, al que describieron como una nueva especie nombrada *Klebsiella variicola*. En este estudio se corroboró que el uso de los genes *housekeeping gyrA*, *parC*, *rpoB*, *mdh*, de manera particular o realizando una concatenación de los mismos, ayudan en una identificación entre *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, sin embargo, entre las especies de *K. pneumoniae* y *K. variicola*, aún se genera un grado de confusión ya que la cepa *K. variicola* HKUPLA, que fue identificada previamente por Guan-Xi Lu y col. en 2015, donde solo compara la homología del genoma con la cepa At-22 (Pinto y col. 2009) encontrando un 95% de identidad en la secuencia, no obstante las especies *pneumonie* y *variicola* comparten el 97% de identidad en el genoma, las cepas KpMx y KvMx-2 fueron identificadas como *K. pneumonie* y *K. variicola* respectivamente con base al modelo de PCR diseñado por Tinoco en el 2013, donde se realiza la amplificación de genes únicos para cada una de las especies, permitiendo tener una clasificación certera (Reyna, 2016).

El género *Klebsiella* comparte funciones entre las especies perteneciente a este grupo, tales como, fermentadoras de lactosa, no formadoras de esporas, no presentan motilidad, formación de capsulas dando lugar a 77 tipos diferentes, sin embargo, cada especie presenta rutas metabólicas que difieren una especie de otra, como fijación de nitrógeno, hidrolización de urea, producción de 2,3-butanediol, bacteriocinas, hemolisinas entre otras (Gundogan, 2014), en el presente estudio se analizaron tres cepas pertenecientes al género de *Klebsiella* de diferente especie, en la interacción

con ooquistes del protozoario *Eimeria* que infecta aves de corral, observando que las 3 cepas provocan un daño a la integridad de las paredes ooquisticas de manera similar (Figura 9, 10) con base a estos resultados, se infiere que las tres cepas podrían estar compartiendo el modo de acción antiprotozoario, es por ello que se realizó una comparación genómica de las tres cepas usando solo los genes que codifican para proteínas, de dicha comparación fue utilizada la lista de genes Core, es decir, los genes que están contenidos en los 3 genomas para realizar la búsqueda de los genes que pudieran estar involucrados en dicha actividad, Wyres y Holt (2016) encuentran que tan solo en los genomas de *K. pneumoniae* que se encuentran secuenciados en diversas bases de datos con un promedio aproximado de 5500 genes por genoma, el Core alberga cerca de 2000 genes, muy cerca de la mitad de genes promedio, en este estudio se encontraron 2048 genes que codifican para proteínas contenidos en el Core de 3 distintas especies del generó de *Klebsiella*, es decir estas tres especies están estrechamente relacionadas ya que al involucrar las especies de *K. oxytoca* y *K. varicolla* el promedio del número del Core no disminuye ni aumenta considerablemente.

En la actualidad se han reportado estudios de interacciones entre bacterias y protozoarios en animales utilizados para la producción de carne para consumo humano (cabras, vacas, cerdos), Meng-Zhi y col. (2008) realizaron un estudio con bacterias encontradas en el rumen de cabras, marcadas con fluorescencia para observar la interacción que presentaba en presencia de los protozoarios que afectan la producción de estos organismos, usaron bacterias aisladas sin los fluidos del rumen y con fluidos del rumen, donde el 82.4% de las proteínas contenidas en esos fluidos son producto de la degradación realizada por dichas

bacterias (Sok y col., 2017) se incubaron con los protozoarios durante 40 min a 39°C en agua, en el experimento con el líquido del rumen realizaron una cuantificación de las proteínas previo a la incubación, observaron que conforme pasaba el tiempo las bacterias marcadas con fluorescencia disminuían al igual que las proteínas contenidas en el líquido del rumen, es decir, estaban siendo depredadas por los protozoarios, en este estudio se observó que al incubar bacterias del genero de *Klebsiella* con protozoarios del genero *Eimeria*, estas actuaban como depredadores del protozoario ya que eran ellas las que causaba daño a los protozoarios. Este género también forma parte de la microbiota de animales usados para la producción de carne (cerdo, vacas, aves entre otros), sin embargo, aunque se trate de un organismo bacteriano, no todos realizan las mismas funciones, es decir, cuentan con diferentes mecanismos que permiten la sobrevivencia, desde la obtención de nutrientes para el crecimiento, hasta los mecanismos para contender en ambientes adversos. Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se observó que las tres cepas del mismo género, pero diferente especie, comparten el modo de acción en contra del protozoario, y que probablemente el mecanismo de acción para producir la o las moléculas involucradas pueda ser el mismo, sin embargo, no es un mecanismo específico para atacar al protozoario, si no que se trata de un mecanismo indirecto que pudiera estar involucrado en otra función.

12. Conclusiones

La actividad anicoccidiana observada en las cepas del genero *Klebsiella* no está relacionada con la historia de vida que estas presentan, debido a que las cepas KpMx-1 y KvMx-2 fueron aisladas de cultivo de caña en un habitat endófito y presentaron una actividad igual, sin diferencia significativa, a la cepa Kox-Ac, que se aisló de una cama aviar en Tehuacán, Puebla.

La actividad observada en el sobrenadante demuestra que no es necesaria la presencia del protozoario para la producción de la o las moléculas involucradas en la actividad anticoccidiana, ya que, para la obtención del sobrenadante, se realizó un crecimiento en medio liquido de cada una de las cepas sin el protozoario, se separó la pastilla celular y se obtuvo el sobrenadante.

La actividad que las cepas presentan con el extracto intracelular y el decremento que se presenta en el extracto intracelular tratado con tripsina soporta la idea de que la o las moléculas que realizan dicha actividad en el extracto intracelular son de origen proteico. Además de que podrían estar realizando una actividad proteolítica, ya que la actividad es inhibida por una serie de inhibidores de proteasas, y probablemente esté realizando una interacción con algún ion, ya que al adicionar EDTA, la actividad disminuye considerablemente.

13. Perspectivas

Es interesante la estrecha relación genómica que estas tres cepas albergan, sin embargo, sería interesante observar el comportamiento del Core al aumentar los genomas de las tres cepas, y realizar un análisis de los genes contenidos en este, así como observar si los genes candidatos propuestos en este trabajo se albergan en este.

Con base en los resultados obtenidos de actividad antiprotozoaria en presencia del EDTA, podría realizarse un zimograma coopolimerizado con gelatina para identificar el punto donde se inhibe la actividad proteolítica del extracto intracelular tratado con EDTA y hacer una comparación con el extracto sin la presencia de este.

Una vez obtenido el o los genes que están involucrados en dicha actividad, podrían realizarse mutaciones de cada uno de estos, esto con el fin de observar si dichos genes están directamente relacionados con la actividad o bien son precursores de la molécula involucrada.

14. Literatura citada

1. Alaa Aldin Alnassan A. A., Thabet A. Dauschies A. and Bangoura B. (2015). In vitro efficacy of allicin on chicken *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol Res.* 114: 3913–3915.
2. Abbas M. M., Malluhi Q. M. y Balakrishnan P. (2014) Assessment of *de novo* assemblers for draft genomes: a case study with fungal genomes. *BMC Genomics.* 15(Suppl 9): S10
3. Abbas R. Z., Colwell D. D. and Gilleard J. (2012). Botanicals: an alternative approach for the control of avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal.* 68: 203 – 215.
4. Arenas NE, Gutiérrez AJ. (2009). Construction of a molecular phylogeny for *Klebsiella* and *Raoultella* sp based on *rRNA 16S* and RNA polymerase subunit genes. *Rev.Cienc.Salud.Bogotá (Colombia)*, 22-29.
5. Barbour E.K., Bragg R.R., Karrouf G., Iyer A., Azhar E., Harakeh S. and Kumosani T. (2014). Control of eight predominant *Eimeria* spp. involved in economic coccidiosis of broiler chicken by a chemically characterized essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 118, 583—591.
6. Belli S. I., Smith N. C., and Ferguson D. J.P. (2006). The coccidian oocyst: a tough nut to crack!. *Trends in Parasitology.* 22:9 416-423.
7. Blake D. P. and Tomley F. M. (2014). Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends in Parasitology.* 30:12.
8. Brisse S. and Verhoef J. (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51, 915–924
9. Bozkurt M., Selek N., Küçükyılmaz K., Eren H., Güven E., Çatli A. U. and Çinar M. (2012). Effects of dietary supplementation with a herbal extract on the performance of broilers infected with a mixture of *Eimeria* species. *British Poultry Science* 53:3 325-332.

10. Bozkurt M., Giannenas I., Küçükyılmaz K., Christaki E. and Florou P. (2013). An update on approaches to controlling coccidia in poultry using botanical extracts. *British Poultry Science*. 54:6 713–727.
11. Bushkin G. G., Motari E., Magnelli P., Gubbels M-J., Dubey J. P., Miska K. B., Bullitt E., Costello C. E., Robbins P. W., and Samuelson J. (2012) β -1,3-Glucan, Which Can Be Targeted by Drugs, Forms a Trabecular Scaffold in the Oocyst Walls of *Toxoplasma* and *Eimeria*. (mBio.asm.org). Volume 3 pp 8-12
12. Chapman H.D., Barta J. R., Blake D. Gruber A. Jenkins M., Smith N. C., Suo X., Tomley F. M. (2013). A Selective Review of Advances in Coccidiosis Research. *Advances in Parasitology*. Vol: 83 Cap: 1:93-117.
13. Chapman H.D., Cherryb, T.E. Danforthc H. D., Richardsd G., Shirleye M. W. Williams R. B. (2002). Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *International Journal for Parasitology* 32: 617–629.
14. Cha J. O., Talha M. S. F. A., Lim W. C. and Kim B. (2014). Effects of glass bead size, vortexing speed and duration on *Eimeria acervulina* oocyst excystation. *Experimental Parasitology*. 138: 18-24.
15. Dantán G. E. Quiroz C. R. E., Cobaxin C. M., Valle H. J., Gama M. Y., Tinoco V. J. R. Serrano C. L. and Ortiz H. L. (2015). Impact of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from chickens against *Eimeria* sp. protozoan, an in vitro analysis. *BMC Veterinary Research* (2015) 11:278.
16. Ferguson D.J.P., Bellib S.I., Smithb N.C., and Wallach M.G. (2003). The development of the macrogamete and oocyst wall in *Eimeria maxima*: immuno-light and electron microscopy. *International Journal for Parasitology*. 33: 1329–1340.
17. Gama M. Y. 2015. Identificación molecular de microorganismos aislados a partir de sustrato de heces de aves y suspensiones vacunales para la evaluación de actividad anticoccidiana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 58 Pp.
18. García M. I., Muñoz A. B., Aguirre A. I. Polo R. I., García M. A., Refoyo R. P. Manuel de Laboratorio de Parasitología.

- Coccidios intestinales y tisulares.
Reduca (Biología). Serie Parasitología. 1 (1): 38-48, 2008.
19. Geriletua, Xua L., Xurihua, Li X. (2011). Vaccination of chickens with DNA vaccine expressing *Eimeria tenella* MZ5-7 against coccidiosis. *Veterinary Parasitology* 177: 6-12.
 20. Gundogan N. (2014). *Klebsiella*. Elsevier. 2:1107-1115
 21. Huang J., Zhang Z., Li M., Song X., Yan R., Xu L. and Li X. (2015). *Eimeria maxima* microneme protein 2 delivered as DNA vaccine and recombinant protein induces immunity against experimental homogenous challenge. *Parasitology International* 64: 408–416.
 22. Jiang L., Hea L. and Fountoulakis M. (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1023 317–320.
 23. Lu MG-X, Jiang J, Liu L, Ma AP-Y, Leung FC-C. (2015). Complete genome sequence of *Klebsiella variicola* strain HKUOPLA, a cellulose-degrading bacterium isolated from giant panda feces. *Genome Announc* 3(5):e01200-15. doi:10.1128/genomeA.01200-15.
 24. Mai K., Sharman P. A., Walker R. A., Katrib M., De Souza David, McConville M. J., Wallach M. G., Belli S. I., Ferguson D. J. P., and Smith N. C. (2009). Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 104(2): 281-289.
 25. Oakes R. D., Kurian D., Bromley E., Ward C., Lal K., Blake D.P., Reid A. J., Pain A., Sinder R. E., Wastling J. M., Tomley F.M. (2013). The rhoptry proteome of *Eimeria tenella* sporozoites. *International Journal for Parasitology*. 43: 181-188.
 26. Peek H. W. and Landman W.J.M. (2011). Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Veterinary Quarterly*. 31: 3: 143–161.
 27. Pinto-Tomas AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FS, Cleland WW, Weimer PJ, Currie CR. 2009. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science* 326(5956), 1120-1123.
 28. Quiroz C. R. E. and Dantán G. E. (2015). Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. *Bio. Med. Research International*. 1-12.

- 29.Reyna F. F. L. 2016. Identificación y análisis comparativo entre *Klebsiella variicola* y *Klebsiella pneumoniae* en aislamientos clínicos y ambientales. Tesis de maestría. Centro de investigaciones en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- 30.Shirley W. M., Smith A. L. and Blake D. P. (2007). Challenges in the successful control of the avian coccidian. *Vaccine*. 25: 5540-5547.
- 31.Scott D. y Ely B. (2015) Comparison of genome sequencing technology and assembly methods for the analysis of a GC-rich bacterial genome. *Curr. Microbiol.* 70(3): 338-344 pp.
- 32.Song X., Huang X., Yan R., Xu L. and Li X. (2015). Efficacy of chimeric DNA vaccines encoding *Eimeria tenella* 5401 and chicken IFN- γ or IL-2 against coccidiosis in chickens. *Experimental Parasitology* 156: 19-25.
- 33.Stuer W., Jaeger K. E. And Winklerl U. K. (1986). Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of BacterioloGY*, 168:3 1070-1074
- 34.Tinoco, P. 2013. IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES QUE PERMITAN DIFERENCIAR A *Klebsiella variicola* DE *Klebsiella pneumoniae*. TESIS DE MAESTRIA. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA.
- 35.Wang M., Wong H., Li G., CaO H., and Lu Z. (2008). The preliminsry report in rumen protozoa grazing rate on bacteria with a fluorescence-labeled technique. *Agricultural*. 7(6):768-774.
- 36.Williams R. B. (2002). Anticoccidial vaccines for broiler chickens: Pathways to success. *Avian Pathology*. 31: 317–353.
- 37.Yuño, M.M. and Gogorza, L.M. (2008). Coccidiosis aviar: respuesta inmune y mecanismos de control en la industria avícola. *Rev. Vet.* 19: 1, 61–66.

14.1 Citas de Internet

1. Yuño, M.M. y Gogorza, L.M. (2013). ¿Son los coccidios aviares inmunógenos efectivos? Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Albeitar. <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/9174/articulos->

<aves-archivo/son-los-coccidios-aviares-inmunogenos-efectivos.html>.

Fecha de consulta: 26 de junio 2016, 3:00 am.

2. Juárez E. M. A. (2016). El Conocimiento Puntual de la Invasión de Eimeria sp a los Enterocitos de las Gallinas como Base de la Generación de Nuevas Estrategias Efectivas de Inmunización contra Coccidia Aviar. BM Editores. <http://bmeditores.mx/conocimiento-puntual-invasion-eimeria-sp/>. Fecha de consulta 26 de junio 2016. 2:00 am.