



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE LA VACUNA DE
SUBUNIDADES PLD Y CP40 FRENTE A *Corynebacterium*
***pseudotuberculosis ovis* EN UN MODELO MURINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

M. EN CARN. MARIA CARLA RODRÍGUEZ DOMÍNGUEZ

Toluca, Estado de México. Febrero, 2025



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE LA VACUNA DE
SUBUNIDADES PLD Y CP40 FRENTE A *Corynebacterium*
***pseudotuberculosis ovis* EN UN MODELO MURINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

M. EN CARN. MARIA CARLA RODRÍGUEZ DOMÍNGUEZ

COMITÉ DE TUTORES

Tutor Académico: Dr. en C. Roberto Montes de Oca Jiménez

Tutor Adjunto: Dr. en C. Ricardo Wagner Dias Portela

Toluca, Estado de México. Febrero, 2025

¡Gracias a mi Familia por tanto amor!

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que participaron en el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología por la beca y soporte económico.

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), por todo el apoyo brindado y disposición de las instalaciones.

Gracias a los siguientes proyectos de investigación se contó con el financiamiento económico para el desarrollo de la tesis y bajo la responsabilidad del Doctor en Ciencias Roberto Montes de Oca Jiménez.

1. **PROYECTO: 6242/2020CIB:** Desarrollo de una vacuna de subunidades recombinantes contra Linfadenitis Caseosa.
2. **PROYECTO: 6533/2022CIB:** Evaluación de la viabilidad celular y de la respuesta inmune de la vacuna de subunidades (*pld* y *cp40*) frente a *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* en el modelo murino.
3. **PROYECTO: 6784/2022CIC:** Análisis de las islas de patogenicidad de aislados mexicanos de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* a través del estudio de secuenciación del genoma completo.

A todos los profesores del posgrado, al Dr Valente Velázquez Ordoñez que ha sido fuente de sabiduría y apoyo.

A mis tutores, en especial al Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez, que ha sido mi mentor a lo largo de la Maestría y el Doctorado, transmitiendo sus conocimientos, apoyo incondicional y su amistad, le estaré siempre agradecida.

A mis compañeros de posgrado por los buenos momentos compartidos, en especial a Ariadna Rodríguez Pérez, gracias por todo tu apoyo en el laboratorio y tu linda amistad.

A mi esposo, este logro es de ambos, muchas gracias por tu dedicación y ayuda profesional.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	4
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
II. 1 Linfadenitis caseosa: Situación mundial	6
II. 2 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	10
II. 3 Factores de virulencia de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	12
II. 4 Linfadenitis caseosa: Patogenesis	16
II. 5 Sistema inmune	19
II.6 Respuesta inmune frente a <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i>	32
II.7 Vacunas comerciales contra LAC	34
II.8 Vacunas experimentales de subunidades proteicas PLD y CP40	36
II.9 Adyuvantes: saponinas	41
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
IV. JUSTIFICACIÓN	51
V. HIPÓTESIS	52
VI. OBJETIVO GENERAL	53
VI.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	54
VIII. RESULTADOS	64
IX. DISCUSIÓN	109
X.CONCLUSIONES	151
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINAS
Figura 1. Características morfológicas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> .	11
Figura 2. Manifestaciones patológicas de la Linfadenitis caseosa, formación de abscesos cutáneos y viscerales.	18
Figura 3. Presentación de antígenos y activación de Linfocitos T CD4 ⁺ en el contexto del MHC-II.	27
Figura 4. Presentación de antígenos y activación de Linfocitos T CD8 ⁺ en el contexto del MHC-I.	29
Figura 5. Mecanismos de acción de los adyuvantes.	42
Figura 6. Esquema de Inmunización y Desafío de los grupos experimentales.	60
Figura 7. Red de interacción de la proteína PLDr 2J-L.	65
Figura 8. Red de interacción de la proteína CP40r 2J-L.	66
Figura 9. Simulación de la activación de células presentadoras de antígenos ante la inmunización con las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.	71
Figura 10. Simulación de la respuesta de Linfocitos B ante la inmunización con las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.	72
Figura 11. Predicción de la producción de inmunoglobulinas ante la inmunización con PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.	73
Figura 12. Simulación de la respuesta celular ante la inmunización con las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.	74
Figura 13. Simulación de la respuesta celular mediada por los Linf Tc ante la inmunización con las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.	75
Figura 14. Simulación de la concentración de citoquinas ante la inmunización con las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.	75
Figura 15. Análisis de las fracciones de purificación de las proteínas recombinantes.	76

FIGURAS	PÁGINAS
Figura 16. Lesiones provocadas por el efecto tóxico de las formulaciones con la proteína PLDr 2J-L sin inactivar.	78
Figura 17. Identificación de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> aislado de absceso del sitio de inoculación de animales del grupo experimental desafiado con 104 UFC/mL.	79
Figura 18A. Piel del sitio de inoculación vía subcutánea de ratones de los grupos experimentales a los 21 días de concluido el esquema de vacunación, teñidos con Hematoxilina y Eosina.	80
Figura 18B. Análisis histopatológico de muestras de tejido esplénico de animales de los grupos experimentales a los 21 días de concluido el esquema de vacunación.	81
Figura 19. Cronología de la probabilidad de supervivencia (%) analizada a partir de 20 ratones de cada grupo experimental desafiados con <i>C. pseudotuberculosis ovis</i> cepa ATCC 43926 (10^4 UFC/mL), con un intervalo de 21 días entre cada inmunización y el desafío.	83
Figura 20. Formación de abscesos en órganos de animales del grupo experimental control del desafío (G6).	83
Figura 21.3 Pulmón de ratones del Grupo G6 control del desafío, tinción Hematoxilina y Eosina.	85
Figura 21.4. Riñón de ratones del Grupo G6 control del desafío, tinción Hematoxilina y Eosina.	86
Figura 21.5. Hígado de ratones del Grupo G6 control del desafío, tinción Hematoxilina y Eosina.	87
Figura 21.6. Corazón de ratones del Grupo G6 control del desafío, tinción Hematoxilina y Eosina.	88
Figura 22. Curva ROC y distribución individual de absorbancias	90
Figura 23. Análisis de la curva ROC para establecer el valor de corte de la prueba ELISA en la detección de anticuerpos anti-CP40r.	91
Figura 24. Curva ROC para establecer el valor de corte de la prueba ELISA anti PLDr+CP40r.	92
Figura 25. Niveles de anticuerpos totales IgG anti-PLD evaluados mediante ELISA.	94
Figura 26. Niveles de anticuerpos totales IgG anti-CP40 evaluados mediante ELISA.	94

FIGURAS	PÁGINAS
Figura 27. Niveles de anticuerpos totales IgG anti-PLD+CP40 evaluados mediante ELISA.	95
Figura 28. Selección de parámetros con muestras controles marcadas con los anticuerpos por separado.	96
Figura 29. Identificación de la población de linfocitos B del bazo por Citometría de flujo.	97
Figura 30. Identificación de la población de linfocitos T del bazo por Citometría de flujo.	97
Figura 31. Identificación de la población de monocitos del bazo por Citometría de flujo.	98
Figura 32. Porcentaje de Linfocitos B del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> cepa ATCC 43926 (72 días).	99
Figura 33. Porcentaje de Linfocitos T CD3 ⁺ del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> cepa ATCC 43926 (72 días).	100
Figura 34. Porcentaje de Linfocitos T CD4 ⁺ del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> cepa ATCC 43926 (72 días).	101
Figura 35. Porcentaje de Linfocitos T CD8 ⁺ del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> cepa ATCC 43926 (72 días).	102
Figura 36. Porcentaje de monocitos CD14 ⁺ del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> cepa ATCC 43926 (72 días).	102
Figura 37. Porcentaje de las poblaciones celulares del bazo de ratones BALB/c vacunados y desafiados con <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> cepa ATCC 43926 (30 días post desafío).	103

ÍNDICE DE CUADROS

CUADROS	PÁGINAS
Cuadro 1. Principales factores de virulencia de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> .	13
Cuadro 2. Vacunas experimentales contra la Linfadenitis Caseosa.	40
Cuadro 3. Curva Patrón para la cuantificación de proteínas basada en concentraciones conocidas de BSA (2mg/mL).	57
Cuadro 4. Especificaciones de los anticuerpos para la fenotipificación de células del sistema inmune en el bazo mediante Citometría de Flujo.	62
Cuadro 5. Proteínas de la red de interacción de PLDr 2J-L evaluada <i>in silico</i> con el programa String, con parámetros de 20 - 50 interacciones y valor de confianza (score: 0.7).	67
Cuadro 6. Proteínas de la red de interacción de CP40r 2J-L evaluada <i>in silico</i> con el programa String, con parámetros de 20 interacciones y valor de confianza (score: 0.5-0.7).	68
Cuadro 7. Epítomos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para la activación de Linfocitos T en el contexto del MHC clase I.	69
Cuadro 8. Epítomos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para la activación de Linfocitos T en el contexto del MHC clase II.	70
Cuadro 9. Epitopos de Linfocitos B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, para la simulación de la respuesta inmune humoral mediante el programa C-ImmSim.	71
Cuadro 10. Epitopos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para la activación de Linf T en el contexto de la presentación de antígenos por el MHC-I y MHC-II, para la simulación de la respuesta inmune celular por el programa C-ImmSim.	74
Cuadro 11. Cuantificación de las proteínas de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L presente en las diferentes fracciones de la purificación.	77
Cuadro 12. Porcentaje de supervivencia de animales inmunizados con diferentes formulaciones vacunales y desafiados con <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> cepa ATCC 43926 (10 ⁴ UFC/mL).	82

CUADROS	PÁGINAS
Cuadro 13. Hallazgos histopatológicos en animales del grupo experimental control del desafío (G6).	84
Cuadro 14. Análisis histopatológico de muestras de órganos de animales vacunados 30 días post desafío con <i>C. pseudotuberculosis</i> cepa ATCC 43926 (10^4 UFC/mL).	89
Cuadro 15. Comparación de resultados de la normalización de los sistemas ELISA con las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.	93
Cuadro 16. Porcentaje de linfocitos B, linfocitos T y monocitos del bazo de animales vacunados y 30 días post desafío determinados mediante Citometría de Flujo.	99

RESUMEN

La ganadería ovina y caprina se ve gravemente afectada por la Linfadenitis caseosa, enfermedad infecto-contagiosa ocasionada por la bacteria Gram positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. El agente patógeno origina abscesos cutáneos y/o viscerales, provocando pérdidas económicas significativas en la industria de los pequeños rumiantes. La profilaxis se lleva a cabo mediante la aplicación de vacunas comerciales formuladas con cultivos bacterianos totales inactivados; sin embargo, la protección conferida no ha sido eficaz para el control de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo es evaluar la respuesta inmune de la vacuna de subunidades PLDr 2J-L y CP40r 2J-L frente a *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* en un modelo murino. Se realizó una predicción *in silico* de la red de interacción de proteínas con el programa String, la predicción de epitopos de linfocitos T de ambas proteínas en el contexto de la presentación de antígenos mediada por el MHC-I y MHC-II con el programa Immune Epitope Data Base and Analysis Resource (score 0.5) , así como la simulación de la respuesta inmune humoral y celular ante la aplicación de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como antígenos en un formulado vacunal con el programa C-ImmSim. Se determinó *in vivo* la dosis letal media de la vacuna en el modelo murino, ratones BALB/c y se realizó la evaluación de la respuesta inmune de la vacuna en un modelo murino ante el desafío con 10^4 UFC/mL de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* ATCC 43926. Se evaluaron tejidos y órganos mediante histopatología, los niveles de anticuerpos por inmunoensayo tipo ELISA indirecto y las poblaciones celulares Linfocitos B, Linfocitos T (CD4+ y CD8+) y macrófagos a través de Citometría de Flujo. La predicción *in silico* de la red de interacción de proteínas evidenció que PLDr 2J-L y CP40r 2J-L establecen relación entre proteínas asociadas con la virulencia, la adquisición de hierro, adherencia y metabolismo. En la proteína PLDr 2J-L se identificaron 16 péptidos (MHC-I) y 10 péptidos (MHC-II), mientras que en la proteína CP40r 2J-L la predicción mostró 15 péptidos (MHC-I) y 10 péptidos (MHC-II). Ambas proteínas contienen epítomos con capacidad de activación de LinF T en el contexto de diferentes alelos del MHC-I y MHC-II. Los resultados de la simulación con el programa C-ImmSim mostraron la capacidad de las proteínas recombinantes de inducir una respuesta humoral con un aumento en la población de LinF B y la generación de respuesta adaptativa con la producción de IgG1, principalmente. De las poblaciones celulares de LinF T CD4+ se presentó en mayor proporción el subconjunto Th1. La predicción en la presentación de antígenos por parte de los macrófagos y células dendríticas fue dirigida por la acción de las moléculas MHC-II, las cuales participan en la activación de LinF T CD4+ y LinF B por encima de una respuesta de LinF T CD8+. Las proteínas recombinantes PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L se expresaron utilizando el sistema heterólogo de células *E. coli* BL21 DE3 transformadas con el plásmido pET28a-pld y pET28a-cp40 y la purificación mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos. Las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L sin

inactivar mostraron dosis letales medias DL_{50} de 36.11 μ g y 67.04 μ g, y dosis letales total DL_{100} de 60.8 μ g y 122.7 μ g, respectivamente. El estudio permitió realizar el cálculo de la DL, identificar los órganos blanco y otras manifestaciones clínicas de toxicidad de las formulaciones, y establecer un intervalo de dosis para la aplicación de la vacuna en el análisis de la respuesta inmune en el modelo murino. El tratamiento de las proteínas por método térmico eliminó los efectos tóxicos, sin el reporte de muertes en los animales de los grupos experimentales inoculados con las proteínas inactivadas. El análisis histopatológico de muestras de órganos de los animales vacunados y desafiados mostró evidencia de la activación del sistema inmune con infiltración de células mononucleares e hiperplasia del tejido linfóide. En los animales del Grupo 6 control del desafío se desarrollaron abscesos cutáneos y viscerales, mostrando evidencias de la reproducción de la enfermedad en el modelo murino. Luego del desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 el grupo vacunado con la formulación en base a PLDr 2J-L+CP40r 2J-L (Grupo 3) mostró un 75% de supervivencia seguido del Grupo 4 (PLDr 2J-L) con 70% y Grupo 5 (CP40r 2J-L) con 65%. Se estandarizaron sistemas ELISA para la detección de IgG totales anti-PLD y anti-CP40 con porcentajes elevados de sensibilidad y especificidad. La respuesta inmune humoral evaluada mediante la detección de IgG totales mostró valores superiores en los Grupo G3 y G4, siendo el antígeno PLDr el de mayor contribución en la producción de anticuerpos. La respuesta inmune celular evaluada mediante la fenotipificación de las poblaciones de LinF B(CD19+), LinF T (CD4+, CD8+) y monocitos (CD14+) por Citometría de flujo fue superior en los animales del grupo G3 inmunizados con ambas proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. El análisis global del porcentaje de las poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune inducida a los 30 días post desafío fueron superiores en los animales que recibieron la inmunización con ambas proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. Estos resultados evidencian el potencial de la formulación PLDr 2J-L y CP40r 2J-L + Saponina para inducir una respuesta de tipo humoral y celular, con protección del 75% de los animales desafiados.

ABSTRACT

Sheep and goat farming is severely affected by Caseous lymphadenitis, an infectious-contagious disease caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. The objective of this work is to evaluate the immune response of the PLD and CP40 subunit vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* in a murine model. *In silico* prediction of the protein interaction network with the program String showed that PLDr 2J-L and CP40r 2J-L establish a relationship between proteins associated with virulence, iron acquisition, adherence, and metabolism. In PLDr 2J-L protein, 16 peptides (MHC-I) and 10 peptides (MHC-II) were identified, while in the CP40r 2J-L protein the prediction showed 15 peptides (MHC-I) and 10 peptides (MHC-II). Both proteins contain epitopes capable of activating LinF T in the context of different alleles of MHC-I and MHC-II. The results of the simulation with the C-ImmSim program showed the capacity of the recombinant proteins to induce a humoral response with an increase in the population of Lymph B and the generation of an adaptive response with the production of IgG1, mainly. Of the cell populations of LinF T CD4+, the Th1 subset was present in greater proportion. PLD and CP40 of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* Mexican isolate 2J-L were expressed using the heterologous system of *E. coli* BL21 DE3 cells transformed with the plasmid pET28a-pld and pET28a-cp40. The uninactivated PLDr 2J-L and CP40r 2J-L proteins showed median lethal doses LD50 of 36.11 µg and 67.04 µg, and total lethal doses LD100 of 60.8 µg and 122.7 µg, respectively. The treatment of the proteins by thermal method eliminated the toxic effects, with no deaths reported in the animals of the experimental groups inoculated with the inactivated proteins. The histopathological analysis of organ samples from the vaccinated and challenged animals showed evidence of the activation of the immune system with infiltration of mononuclear cells and hyperplasia of the lymphoid tissue. After challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* strain ATCC 43926, the group vaccinated with the formulation based on PLDr 2J-L+CP40r 2J-L (Group 3) showed a 75% survival rate, followed by Group 4 (PLDr 2J-L) with 70% and Group 5 (CP40r 2J-L) with 65%. ELISA systems were standardized for the detection of total anti-PLD and anti-CP40 IgG with high percentages of sensitivity and specificity. The humoral immune response (total IgG) showed higher values in G3 and G4, with the PLDr antigen contributing the greatest amount to antibody production. Cellular immune response assessed by phenotyping of LinF B (CD19+), LinF T (CD4+, CD8+) and monocyte (CD14+) populations by flow cytometry was higher in animals of group G3 (PLDr 2J-L+ CP40r 2J-L). Percentage of cell populations involved in the immune response induced at 30 days post challenge showed that these were higher in animals that received immunization with both PLDr 2J-L and CP40r 2J-L proteins.

I. INTRODUCCION

La Linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad bacteriana infecto-contagiosa que genera pérdidas económicas significativas en la ganadería de los pequeños rumiantes a nivel mundial. El agente etiológico de la enfermedad, *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*, es un cocobacilo gram-positivo, no móvil, no esporulado y anaerobio facultativo (Dorella *et al.*, 2006). Las lesiones características de la LAC incluyen la formación de abscesos en nódulos linfáticos superficiales y/o viscerales; las lesiones en nódulos linfáticos superficiales pueden fistularse y drenar el contenido purulento y dispersar al agente patógeno (Bernard *et al.*, 2012). Las manifestaciones cutáneas de la enfermedad cursan con el desarrollo de abscesos en nódulos linfáticos superficiales, como los cervicales, retrofaríngeos, subilíacos (prefemorales), mamarios, inguinales y poplíteos. Mientras que las manifestaciones viscerales implican la formación de abscesos en nódulos internos (mediastínicos y mesentéricos) y en órganos como pulmones, hígado y riñón. La enfermedad puede instaurarse con un curso crónico que conlleva a la pérdida de peso, anorexia y neumonía, con una morbilidad de hasta un 15% (Dorella *et al.*, 2006).

La LAC afecta la obtención de lana (Paton *et al.*, 1994), carne (Bruning-Fann *et al.*, 2004) y leche (Langova *et al.*, 2022), así como causa daños en la reproducción (Faeza *et al.*, 2019). El rendimiento en la producción de carne se ve alterado con pérdidas en el orden de los \$12-13 millones de dólares australianos (Paton *et al.*, 2003). Otros trabajos estiman pérdidas globales en la producción de carne y carcasas valoradas en \$40 millones de dólares australianos (Windsor *et al.*, 2011). Estudios realizados en Canadá identificaron que un 3-5% de la carne y un 0.02%-0.03% de los animales, son descartados durante procesos de inspección por la presencia de lesiones indicativas de LAC (Williamson *et al.*, 2001), lo que impactan de forma negativa en la comercialización. Por otra parte; los animales que padecen de esta enfermedad son susceptibles a otras enfermedades debido a la inmunodepresión generada principalmente por los daños a nivel de nódulos linfoides lesionados y órganos internos.

En México los datos de prevalencia sobre LAC son limitados; sin embargo, Varela *et al.*, (2018) reporta una frecuencia de 33.3% de la enfermedad en los rebaños del Estado de Jalisco. En este trabajo se realizó la caracterización bioquímica y molecular de aislamientos de *C. pseudotuberculosis ovis*, así como también se identificaron en el 98.2% de los aislamientos genes involucrados en la virulencia: *fag A*, *fag B*, *fag C*, *fag D* y *hsp60*. Se realizó la secuenciación de un segmento del gen *rpoB* y se utilizó para el desarrollo de un análisis filogenético que evidenció porcentajes de similitud entre 98, 99 y 100% en comparación con otras secuencias publicadas en la base de datos del GenBank. Los 57 aislamientos obtenidos del Estado de Jalisco se agruparon en clados compartidos con cepas del biovar *ovis* (Varela *et al.*, 2018). En otro estudio se llevó a cabo la secuenciación de los genes *pld* y *cp40* completos, factores de virulencia obtenidos a partir del aislado 2J-L, proveniente del Estado de Jalisco. Las secuencias de los genes se encuentran ampliamente conservadas, para un 99% de similitud con respecto a otras secuencias de *C. pseudotuberculosis* (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2022). A nivel mundial se comercializan

bacterinas contra la LAC; sin embargo, estas no han logrado conferir protección en todos los rebaños (de Pinho *et al.*, 2021). Actualmente la Organización mundial de sanidad animal (OIE), considera esta enfermedad como una amenaza que incrementa el uso indiscriminado de antimicrobianos, por lo que se necesita el desarrollo de vacunas eficaces (OIE, 2018). La tecnología del ADN recombinante permite obtener antígenos con potencialidades inmunogénicas que pueden ser utilizados en nuevas vacunas, las cuales podrían ser una alternativa para incrementar la protección. Las proteínas PLD y CP40 constituyen factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, y sus potencialidades inmunogénicas han sido evaluadas de forma individual, confiriendo protección en animales infectados experimentalmente con *C. pseudotuberculosis* (Silva *et al.*, 2014; Droppa-Almeida *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018). Los programas para el control de la enfermedad están enfocados en la aplicación de profilácticos, y evitar el uso de antibióticos; sin embargo, en México no se comercializan vacunas contra la LAC. Es por ello que el desarrollo de una vacuna, de producción nacional, utilizando aislados autóctonos constituye una alternativa para abordar esta problemática. El objetivo del presente trabajo es evaluar la respuesta inmune de la vacuna de subunidades PLD y CP40 en un modelo murino frente a *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Linfadenitis caseosa: situación mundial

La Linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad originada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* (*C. pseudotuberculosis ovis*), que afecta a oveja y cabras, con alteraciones en la obtención de carne (Windsor *et al.*, 2011), leche (Paton *et al.*, 2003) y lana (Paton *et al.*, 1994) a nivel mundial (Bruning-Fann *et al.*, 2004). La LAC se caracteriza por la formación de abscesos en nódulos linfáticos cutáneos y/o viscerales, así como lesiones en pulmones, hígado y riñones, originando el desarrollo de estados crónicos (Odha *et al.* 2019). Como resultado de esta patología se producen desórdenes reproductivos (Jesse *et al.*, 2020), decomiso de carnes y vísceras (Belchior *et al.* 2009), pérdida de peso y aumento del costo de producción, medicamentos y atenciones médicas necesarias para tratar la enfermedad.

C. pseudotuberculosis ovis es una bacteria cosmopolita, cuya presencia se ha reportado en diversos países de Europa, Asia, África, Oceanía, Norte América y Latino América (Viana *et al.*, 2018).

La prevalencia de esta enfermedad en Australia se encuentra ampliamente documentada (Windsor, 2011; Bush *et al.*, 2012; Windsor y Bush, 2016) y como resultado de las intervenciones oportunas con programas de vacunación y controles sanitarios de desinfección, se ha logrado una disminución en la prevalencia en diversas regiones del país. Sin embargo, un estudio acerca de los procedimientos de inspección de canales de ovinos y caprinos para la detección de lesiones características de LAC realizado por Pointon y colaboradores indicó que se omiten 86 canales de ovejas y 34 de cabras por cada 10.000 procesadas. El trabajo evidenció la necesidad de implementar procedimientos alternativos en las inspecciones de las canales para tener un mayor control sobre la calidad de la carne y datos actualizados de las afectaciones que esta enfermedad produce (Pointon *et al.*, 2019).

En Europa también se ha reportado la presencia de esta enfermedad, siendo relevante destacar un estudio realizado en España, donde se identificó un brote de LAC en una población de cabra montés, que comprometió al 85.7% de los animales estudiados (Colom-Cadena *et al.* 2014). Por otra parte, en Zaragoza, España de 498 ovinos analizados, 147 (29.52%) presentaron lesiones compatibles con LAC, siendo posteriormente confirmadas mediante el aislamiento de la bacteria. La forma visceral se presentó en 147 de los animales (72.79%), mientras que sólo 32 animales fueron afectados por la forma superficial (21.77%) y 8 (5.44%) estaban afectados con ambas manifestaciones. En la presentación superficial el nódulo linfático retrofaríngeo, como única lesión, fue el más afectado (13/32: 40.63%) y en la forma visceral el 85.06% de los animales tenían las lesiones localizadas en el sistema respiratorio (91/107: 85.06%) (Ruiz *et al.*, 2020).

Otro ejemplo de la presencia de esta enfermedad afectando fauna silvestre lo constituye el reporte de un caso clínico de LAC en un corzo (*Capreolus capreolus*) en Italia, donde se

aisló *C. pseudotuberculosis* de lesiones de abscesos de los pulmones y nódulos linfáticos. Este hallazgo plantea la posibilidad del papel de reservorio de los cérvidos para *C. pseudotuberculosis* y las posibles implicaciones relacionadas tanto con la conservación de la fauna como en la interfaz entre el hogar y la vida silvestre (Di Donato *et al.*, 2024).

En Portugal un estudio de seroprevalencia realizado a partir del análisis de 756 sueros de pequeños rumiantes, mostró que el 70% de las muestras de ovejas (528/756) y el 30% de cabras (228/756) fueron positivas. También se tomaron muestras de los animales que presentaban lesiones internas (n = 58) para la identificación del agente etiológico y se pudo detectar el 57% (13/23) de los casos subclínicos de LAC confirmados mediante examen post-mortem y Reacción en cadena de la polimerasa, PCR (*por sus siglas en inglés*, Polymerase Chain Reaction). Los resultados también revelaron que los animales de las explotaciones lecheras y los que se mantienen en producción no extensiva fueron más susceptibles a la LAC (Costa *et al.*, 2019).

En países africanos también se cuenta con reportes de la presencia de la enfermedad. El análisis de 39 rebaños pequeños en Sharkia, Egipto, para un total de 130 muestras de ovinos y 90 de caprinos, reveló que el 24.54% (54/220) de los animales examinados mostraron lesiones compatibles con LAC, siendo todos los aislados resistentes a la bacitracina y al florfenicol, el 92.6% resistente a la penicilina y la eritromicina y el 16.7% a la vancomicina. Estos resultados resaltan el papel de este microorganismo en la resistencia antimicrobiana (El Damaty *et al.*, 2023).

En Etiopía se realizó un estudio longitudinal desde el año 2011 al 2019 para estimar la prevalencia e incidencia, identificar factores de riesgo y caracterizar bacterias causantes de patologías en 1025 cabras. Se identificaron 1.138 observaciones clínicas y 214 casos de LAC para una prevalencia de un 18.8% según el diagnóstico clínico. La tasa de incidencia fue de 0.14 casos por animal por año. De un total de 214 casos, 130 ocurrieron una vez y 84 fueron casos recurrentes. Los resultados del análisis mostraron que el sexo, la edad y la raza se asociaron ($p < 0,05$) con la incidencia de la enfermedad siendo las hembras, los recién nacidos y las razas Bóer y Boer, Central Highland Goat (CHG), los indicadores de mayor riesgo en comparación con los machos, el grupo de edad de un año y las cabras CHG, respectivamente. El estudio indicó que una alta tasa de incidencia de LAC en las granjas caprinas es difícil de controlar y la prevención debe centrarse en impedir la propagación de la enfermedad, utilizando el aislamiento de animales enfermos, sacrificio y vacunación de rebaños (Tesema *et al.*, 2020).

Por otra parte en un rastro de la provincia de Azerbaiyán Oriental, Irán, fueron seleccionados al azar para su inspección 468 ovejas (335 machos y 133 hembras) con el objetivo de estimar la frecuencia de la LAC. Según los resultados, en 59 (12.60%) de las canales se aisló *C. pseudotuberculosis* y en 94 (20.08%) de los casos los estudios histopatológicos revelaron lesiones características (“exudados laminares” o “aros de cebolla”) de LAC. La frecuencia

de LAC basada en el cultivo bacteriológico fue del 12.60% y en el estudio histopatológico de un 20.08% (Zavoshti *et al.*, 2012).

En la provincia de Duhok, Irak, la inspección de un total de 18, 836 canales (15, 775 ovinos y 3,061 caprinos) indicó una prevalencia de 0.94% y 1.93% en ovinos y caprinos, respectivamente (Khanamir *et al.*, 2023).

Por otra parte, en Corea del Sur el estudio de un total de 1,177 cabras nativas de 110 granjas permitió identificar una tasa de LAC de 19.80%, siendo más de la mitad de las explotaciones agrícolas afectadas por la enfermedad (Aftabuzzaman *et al.*, 2023).

En China se ha reportado la presencia de la LAC y se han caracterizado secuencias del genoma de cepas circulantes de *C. pseudotuberculosis* (Zhou *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018). En la zona Suroeste de China se identificó *C. pseudotuberculosis* en el 39.22 % (40/102) de los aislados analizados y se detectaron genes de virulencia (Li *et al.*, 2018a).

En los principales países productores de ovinos del continente Americano: Canadá, Estados Unidos, Brasil, Argentina, y México, también se ha estudiado la enfermedad como fuente de importantes pérdidas económicas en este sector ganadero.

En Canadá se seleccionaron aleatoriamente un total de 451 ovejas y 34 carneros de dos mataderos en Quebec y se realizó el análisis de las carcasas. La prevalencia de LAC fue $\geq 21\%$ (IC 95%: 17. 24) siendo la cavidad torácica el sitio más frecuente de aparición de lesiones (Arsenault *et al.*, 2003). En este país otro estudio realizado con un total de 157 muestras, identificó un 24.3% de positividad a *C. pseudotuberculosis* y un 54.1% de casos con desarrollo de lesiones de abscesos (Debien *et al.*, 2013).

En California, Estados Unidos se reportó un brote de LAC en un rebaño de 218 ovejas y 32 cabras, donde las ovejas hembra (n = 160) tuvieron títulos de anticuerpos más elevados que los machos ovinos (n = 58) y al contrario en los caprinos, los machos (n = 9) tenían una mayor frecuencia de recuentos de títulos altos frente a las hembras (n = 23) (Burmayan y Brundage, 2021).

En Brasil esta enfermedad afecta a los pequeños rumiantes siendo Minas Gerais una de las regiones más comprometidas con esta patología. El diagnóstico serológico de 642 ovejas provenientes de 97 granjas evidenció una prevalencia de un 70.9% del total de animales y de 95.9% según las granjas analizadas (Guimarães *et al.*, 2009). Posteriormente en esta región se analizaron 805 sueros de ovejas provenientes de 23 granjas, obteniéndose una frecuencia de 43.7% en los animales y de granjas infectadas fue del 100% (Guimarães *et al.*, 2011). Por otra parte en Río de Janeiro el diagnóstico utilizando PCR permitió identificar un 54% (n=202) de muestras positivas a *C. pseudotuberculosis* (Nassar *et al.*, 2015). En la zona del Noreste de Brasil se analizaron de 230 granjas para un total de 2,744 muestras de sueros de cabra. Los resultados de este estudio evidenciaron una sero-prevalencia de un 87.8% a nivel de granja y de 30.3% del total de muestras analizadas (de Farais *et al.*, 2019). Por otra parte el análisis de 2,638 muestras de suero de ovejas de 223 rebaños indicó seropositividad en 996 (37.76%) muestras correspondiente a 210 (94.17%) granjas (Alves *et al.*, 2020).

En la Patagonia la inspección de 600 canales ovinas mostró abscesos en 180 (30%) de los nódulos linfoides y vísceras de consistencia y tamaño anormal. Se identificó *C. pseudotuberculosis* en 123 de las muestras analizadas mediante PCR y secuenciación del gen *16S RNAr* (Estavao *et al.*, 2007).

En México la producción de ovejas y cabras va en aumento; sin embargo, aún es deficiente para satisfacer la demanda y se continúa con las importaciones de ovinos (Bobadilla-Soto *et al.*, 2017), principalmente de Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Estados Unidos y Uruguay, países en los que está presente la enfermedad. Por otra parte, la ovinocultura en México es desarrollada principalmente bajo sistema extensivo, donde el pastoreo constituye una práctica importante para la alimentación de los animales, así como uno de los factores de riesgo de adquirir la LAC.

Varios estudios demuestran la presencia del patógeno afectando las producciones de pequeños rumiantes en territorio mexicano. El trabajo de Ochoa y colaboradores reportó *Corynebacterium spp* en el 5.4% de los exudados nasales de ovejas analizadas (Ochoa *et al.*, 1996). También se ha aislado *Corynebacterium spp.* en el 65% de casos con lesiones en nódulos linfáticos (Barrientos *et al.*, 1996). Otro estudio identificó en cabras procedentes del estado de Durango una prevalencia del 1.75 % en Mapimí y 4.69% en Tlahualilo (Carrillo *et al.*, 2005). En el estado de Jalisco se reportó una frecuencia de LAC de un 33.3% (57 muestras positivas) de un total de 160 muestras analizadas. Los aislamientos positivos se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas y la detección de los genes *16S ARNr*, *rpoB*, *pld*, *fag A*, *fag B*, *fag C*, *fag D* y *hsp60*. La secuencia parcial del gen *rpoB* se utilizó para el análisis filogenético de los aislamientos, los cuales se agruparon junto a cepas del biovar *ovis* y presentaron entre 98 - 100% de similitud en comparación con secuencias de las bases de datos del GenBank (Varela *et al.*, 2018).

También se reportó la secuencia de seis genomas completos de cepas de origen mexicano del biovar *ovis* y biovar *equi*, lo que constituye un precedente para el estudio de los principales factores de virulencia que determinan la patogenicidad de la enfermedad. Las cepas biovar *ovis* de origen mexicano quedaron agrupadas en el árbol filogenético en función del tipo de hospedero y no por la cercanía geográfica (Parise *et al.*, 2018).

Por otra parte, otro trabajo realizó la secuenciación completa de los genes *pld* y *cp40*, utilizando como material genético el ADN total de un aislado (2J-L) de *C. pseudotuberculosis* obtenido de una oveja del Estado de Jalisco. El análisis de las secuencias reveló un elevado porcentaje de similitud (99%) con relación a otros genes *pld* y *cp40* reportados en las bases de datos. El análisis filogenético basado en la secuencia de ambos genes indicó que el aislamiento 2J-L se agrupó con las cepas mexicanas MEX29 y MEX25 (Rodríguez-Domínguez, 2021).

También se identificó *C. pseudotuberculosis ovis* mediante PCR Cuádruplex en 30 de 59 muestras de abscesos cutáneos de ovejas del Estado de Jalisco (Antúñez *et al.*, 2023). Por otra parte en la misma región se identificó *C. pseudotuberculosis* en 19 muestras de lesiones

abscedativas de corderos, siendo un primer reporte de esta enfermedad afectando en México a animales jóvenes (Flores *et al.*, 2023). Debido a la presencia de este agente patógeno en el territorio mexicano es prioritario el desarrollo de investigaciones para su control y futura erradicación.

II.2 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis se clasifica taxonómicamente como integrante del phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Corynebacteriaceae*, género *Corynebacterium* (Von graevenitz y Bernard, 2006; Bernard y Funke, 2012). Se clasifica como bacteria Gram positiva de morfología cocobacilar con dimensiones de 0.5-0.6 μm y 1.0-3.0 μm de amplitud y longitud respectivamente. Presenta la capacidad de sobrevivir en el interior de las células hospederas (intracelular facultativo), no es flagelada, ni esporulada, no produce capsula y su genoma tiene un contenido de G+C de 51 a 68% con un tamaño aproximado de 2.3 millones de pares de bases. Es un microorganismo anaerobio facultativo, puede utilizar como fuente de carbono azúcares como la glucosa, galactosa, maltosa y L-y D-arabinosa sin producción de gas, ni degradación de lactosa (Dorella *et al.*, 2006). Su pared celular se compone principalmente por ácidos micólicos y arabinogalactanos de aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono que se encuentran unidos a heteropolisacaridos formados por arabinosa y galactosa como azúcares principales, glicolípidos y proteínas (Ruiz *et al.*, 2011; Burskoviki *et al.*, 2013). Esta estructura actúa como barrera de protección e intercambio selectivo mediado por moléculas proteicas denominadas porinas que se localizan integradas en la membrana celular (Ruiz *et al.*, 2011; Burkovski *et al.*, 2018). La exotoxina Fosfolipasa D (PLD) representa el factor de virulencia principal de la bacteria y puede ser identificada a través del análisis de hemólisis sinérgica frente a *Rhodococcus equi* o por inhibición de la β hemolisina del *Staphylococcus aureus* (Dorella *et al.*, 2006). En medio de cultivo caldo de Infusión Cerebro-Corazón, BHI (por sus siglas en inglés, Brain Heart Infusion) el crecimiento de *C. pseudotuberculosis* es sin turbidez, con abundante formación de sedimentos de color blanco amarillento de aspecto escamoso (Pacheco *et al.*, 2011). El crecimiento de este microorganismo en medio agar sangre permite la formación de colonias de color blanco-grisáceo, de apariencia opaca, seca y convexa, con formación de hemólisis alrededor del cultivo, y un tamaño aproximado de 1 mm a las 24 horas y de 3 mm luego de 48 a 72h de incubación a 37°C en condiciones de oxígeno reducido (microaerobiosis) (Dorella *et al.*, 2006) (Figura 1).

Las cepas de *C. pseudotuberculosis* se clasifican en dos biovars, biovar *ovis* que no producen la enzima nitrato reductasa y por tanto no degradan nitratos a nitritos (nitrato negativo) y biovar *equi* para aquellas cepas que contienen la enzima (nitrato-positivo). También son denotadas como biotipo I para las cepas aisladas de ovejas y cabras que no hidrolizan el almidón y por lo general no producen toxina Diftérica. Por otra parte las cepas

biotipo II se clasifican como nitrato positivas, utilizan el almidón y pueden producir toxina Diftérica, afectando generalmente equinos y bovinos (Oliveira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017).



Figura 1. Características morfológicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*. Fuente original

Las cepas biovar *ovis* tienen mayor actividad clonal, que las del biovar *equi*, siendo los genes asociados a patogenicidad adquiridos mediante transferencia horizontal de genes y con un elevado grado de conservación entre cepas. Por otra parte los aislamientos biovar *equi* presentan mayor grado de variabilidad en estos genes (Soares *et al.*, 2013)

El biovar *ovis* puede infectar cabras, ovejas (Varela *et al.*, 2018), alpacas (Sprake *et al.*, 2012), antílopes (Muller *et al.*, 2011), cabra montés (Colom-Cadena *et al.*, 2014), también cerdos (Oliveira *et al.*, 2014), llamas (Lopes *et al.*, 2012) y bovinos (Yeruham *et al.*, 2004).

El biovar *equi* produce lesiones abscedativas en el musculo principalmente de la región pectoral en equinos (Muñoz *et al.*, 2016) y en dromedarios (Wernery *et al.*, 2016; Terab *et al.*, 2021). En equinos se puede desarrollar la linfangitis ulcerosa en extremidades, abscesos en el hígado, los riñones y los pulmones (Baraúna *et al.*, 2017), así como pericarditis y pleuritis (Perkins *et al.*, 2004). Este biovar en bovinos ocasiona la linfangitis ulcerativa caracterizada por la generación de abscesos sangrante cutáneos, localizados en la cabeza, cuello y extremidades traseras, por encima de la articulación de la rodilla (Yeruham *et al.*, 2004; Viana *et al.*, 2017).

El potencial zoonótico de esta especie se ha evidenciado a través del estudio de diferentes infecciones en humanos reportadas principalmente en países productores de pequeños rumiantes como Australia (Peel *et al.*, 1997), España (Bartolomé *et al.*, 1995); Francia (Trost *et al.*, 2010), Noruega (Heggelund *et al.*, 2015), Estados Unidos (Willianson, 2001). La enfermedad se manifiesta en humanos con la formación de adenopatías axilares, inguinales o cervicales, producción de fiebre y mialgias, con desarrollo hacia un curso crónico o subagudo, y neumonía (Bastos *et al.*, 2012).

La enfermedad en humanos se asocia principalmente con personal involucrado con actividad de producción ganadera, lo que implica que se debe hacer énfasis en la capacitación con respecto a este padecimiento. En el Reino Unido se realizó un estudio para establecer el nivel de información sobre la enfermedad en veterinarios (264) y agricultores (510), y los resultados evidenciaron que el 18% de los veterinarios encuestados reconocían la LAC y de los granjeros el 45% identificaba en su ganado ovino formación de abscesos. Aunque es una enfermedad ampliamente extendida es poco diagnosticada a nivel de laboratorio, así como tampoco se realizan notificaciones oficiales (Binns *et al.*, 2002).

La identificación de *C. pseudotuberculosis* mediante la técnica de PCR se realiza amplificando segmentos de varios genes para lograr una clasificación hasta biovar. Se utiliza un fragmento del gen 16S ARNr (Cetinkaya *et al.*, 2002) el cual permite establecer diferencias entre *C. diphtheriae* y *C. pseudotuberculosis* presentando una similitud de un 97.8%. Sin embargo, el uso de este gen no es suficiente para diferenciar entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, ya que presentan un porcentaje de similitud de 99.7% (Pascual *et al.*, 1995), y por tanto se requiere de la amplificación de otros genes como *pld* y *rpoB* (Pacheco *et al.*, 2007). Este último es un gen con elevado polimorfismo que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa (Khamis *et al.*, 2004). El gen *rpoB* permite diferenciar hasta el nivel de especie mediante la amplificación de un segmento de 452 pb, siendo el porcentaje de similitud más elevado entre especies de 95.9% lo que permite la correcta diferenciación e identificación por esta técnica (Khamis *et al.*, 2005). El gen *pld* es específico de *C. pseudotuberculosis* y se utiliza para diferenciar esta bacteria de *C. ulcerans* (Pacheco *et al.*, 2007). La clasificación hasta el nivel de biovar se realiza incluyendo en el PCR la amplificación de un fragmento del gen *narG* que codifica para la cadena α de la enzima Nitrato reductasa, siendo la presencia de este gen indicativo del biovar *equi* y la ausencia biovar *ovis* (Almeida *et al.*, 2017).

II.3 Factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

C. pseudotuberculosis presenta genes que codifican para moléculas implicadas en la maquinaria de patogenicidad, estos codifican para los factores de virulencia y están presentes en bloques del genoma denominados islas de patogenicidad PI Cp (*por sus siglas del inglés, Pathogenicity Islands Corynebacterium pseudotuberculosis*) (Ruiz *et al.*, 2011) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*

Factores de Virulencia	Bases Genéticas	Mecanismo de Acción	Referencias
Ácidos Corynomicólicos	Fase I sintetasa, participa en la síntesis y elongación de los ácidos grasos y ácidos micólicos.	Constituyen una barrera que impide la acción de las lisozimas sobre el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, protegiendo a la bacteria de la lisis enzimática. Barrera de protección mecánica.	Burkovski <i>et al.</i> , 2013 Burkovski <i>et al.</i> , 2018 Odah <i>et al.</i> , 2018 Jesse <i>et al.</i> , 2020
Peptidoglicano	El peptidoglicano está conformado por ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP), arabinosa y galactosa.	El peptidoglicano presenta enlace covalente con arabinogalactanos, formando un enrejado que se une a una capa externa de ácidos corynomicólicos. Esta estructura compleja de la pared celular confiere protección ante la acción de las lisozimas y la degradación del peptidoglicano.	Burkovski <i>et al.</i> , 2013 Burkovski <i>et al.</i> , 2018
Fosfolipasa D (PLD)	Gen <i>pld</i> presente en el genoma en la Isla de patogenicidad PICp 1, contiene un marco abierto de lectura de 921pb, secuencia ampliamente conservada en ambos biovars.	Exotoxina con actividad esfingomielinasa, causa edema, inflamación, hemólisis, degeneración, necrosis y congestión.	Hodgson <i>et al.</i> , 1990 Mahmood <i>et al.</i> , 2015
CP40	Gen <i>cp40</i> presente en la isla de patogenicidad PiCp1, con un marco abierto de lectura de 1,137 pb, se encuentra ubicado corriente abajo del gen <i>pld</i> .	Proteína con actividad enzimática endoglicosidasa, con capacidad demostrada <i>in vitro</i> para degradar la región Fc de los anticuerpos IgG.	Walker <i>et al.</i> , 1994 Shadnezhad <i>et al.</i> , 2016
Proteína FagA	Gen <i>fagA</i> presente en el operón FAG, ubicado corriente abajo del gen <i>pld</i> , expresión mediada por la presencia de hierro en el medio.	Proteína integral de membrana involucrada en el mecanismo de adquisición de hierro.	Raynal <i>et al.</i> , 2018
Proteína FagB	Gen <i>fagB</i> presente en el operón FAG, ubicado corriente abajo del gen <i>pld</i> , expresión mediada por la presencia de hierro en el medio	Enterobactina transportadora de hierro. Cepas mutantes deficientes del gen <i>fagB</i> han presentado menor grado de virulencia en comparación con cepas salvajes.	Billington <i>et al.</i> , 2002
Proteína FagC	Gen <i>fagC</i> presente en el operón FAG, ubicado corriente abajo del gen <i>pld</i> , expresión mediada por la presencia de hierro en el medio	Proteína de membrana citoplasmática de unión a ATP, mecanismo de adquisición de hierro	Billington <i>et al.</i> , 2002
Proteína FagD	Gen <i>fagD</i> presente en el operón FAG, ubicado corriente abajo del gen <i>pld</i> , expresión mediada por la presencia de hierro en el medio	Proteína siderófora de unión a hierro, implicado en la adquisición de hierro	Billington <i>et al.</i> , 2002

Factores de Virulencia	Bases Genéticas	Mecanismo de Acción	Referencias
Proteína MALL	Gen <i>mall</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp1	Proteína Oligo 1,6 glicosidasa, favorece la supervivencia en condiciones de estrés y absorción del carbono y Mg^{2+} . El Mg^{2+} funciona como señal reguladora esencial para la virulencia, involucrado en la adaptación térmica, protegiendo a las bacterias contra la fiebre del hospedero.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Factor MgtE	Gen <i>mgt E</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp1, la traducción del gen depende de cambios en la concentración de Mg^{2+} en el citosol.	Proteína transportadora de Mg^{2+} . La pérdida de este gen reduce la formación de biopelículas.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011 Raynal <i>et al.</i> , 2018
Factor TetA	Gen <i>tet A</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp2, transportado por elementos transmisibles como plásmidos, transposones e integrones.	Proteína de eflujo de tetraciclinas. Protege ante la acción de este antibiótico.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Factor SigK	Gen <i>sigK</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp2.	Factor sigma K de la familia de proteínas ECF. Participa en la capacidad de supervivencia intracelular de la bacteria, diseminación a través del torrente linfático y evadir la respuesta del sistema inmune.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Factor DipZ	Gen <i>dipZ</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp2.	Proteína integral de membrana DipZ perteneciente al citocromo de tipo C. Participa en el mecanismo de vida intramacrófagos de la bacteria.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Factor PotG	Gen <i>potG</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp2, gen que forma parte del operón <i>potFGHI</i> , sistema transportador de putrescinas.	Sistema de transporte de putrescina ABC. El gen <i>potG</i> codifica para una proteína de membrana de unión a ATP que proporciona energía para absorción de putrescina (poliamina) desde el espacio periplásmico, funciona como sistema transportador de putrescinas.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Factor afuA	Gen <i>afuA</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp3	Casete transportador de hierro (Fe^{3+}) de unión a ATP de la superfamilia ABC, Proteína de unión.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Proteína phoPR	Constituido por los genes <i>phoP</i> (714 pb) y <i>phoR</i> (1506 pb), presentes en la isla de patogenicidad PI Cp3	Proteína reguladora de componentes involucrados en el metabolismo bacteriano	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Proteínas <i>ciuA</i> , <i>ciuB</i> , <i>ciuC</i> , <i>ciuD</i> , <i>ciuE</i>	Los genes <i>ciuA</i> , <i>ciuB</i> , <i>ciuC</i> , <i>ciuD</i> , <i>ciuE</i> , se encuentra en la PI Cp3, forma parte del operón <i>ciuABCDE</i> (codificante de proteínas para la biosíntesis de sideróforos)	Proteínas que favorecen la viabilidad intracelular, colaborando con la transferencia de hierro desde transferrina, lactoferrina y el complejo hemoglobina-haptoglobina hacia la bacteria. Cepas mutantes de este gen han mostrado una reducción en la virulencia y menor crecimiento en medios de cultivos.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011 Ribeiro <i>et al.</i> , 2014 Raynal <i>et al.</i> , 2018

Factores de Virulencia	Bases Genéticas	Mecanismo de Acción	Referencias
Factor δ 70	Gen <i>s70</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp5	ARN polimerasa putativa factor sigma 70. Responsable del transporte de la maquinaria de transcripción hacia promotores específicos, responsable de la expresión de genes de virulencia.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011 Pacheco <i>et al.</i> , 2012
Proteínas pipA1/ pipB	gen <i>csk E</i> presente en la isla de patogenicidad PI Cp6	Prolina aminopeptidasa que cataliza la remoción de residuos de prolina de los extremos N-terminal de péptido y participa en roles de obtención de energía.	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Proteína ureA	Operón ure presente en la isla de patogenicidad PI Cp7	Subunidad gamma de ureasa, responsable de la adquisición de nitrógeno a través de la hidrólisis de la urea, con la obtención de carbamato y amoniaco. La producción de amoniaco provoca daño celular y compromete la acción del sistema inmune	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Proteína ureB		Subunidad beta de ureasa	
Proteína ureC		Subunidad alfa de ureasa	
Proteína ureE		Proteína accesoria de Ureasa	
Proteína ureF		Proteína accesoria de ureasa ure F	
Proteína ureG		Proteína accesoria de ureasa ure G	
Proteína ureD		Proteína accesoria de ureasa ure D	
Estructura del Pili	Genes que codifican para la estructura del pili: <i>spaA</i> , <i>spaC</i> , <i>spaD</i> , <i>spaE</i> , <i>spaH</i> .	SpaC: codifica para una proteína responsable del anclaje del pili a la pared celular. Spa A y Spa D: Forman parte del pili mayor. Spa B y Spa E: el pili menor. Una estructura completa de pili o incluso el pilis menor pueden realizar contacto inicial con receptores de las células hospedadoras, para facilitar la entrada del microorganismo.	Trost <i>et al.</i> , 2010 Rogers <i>et al.</i> , 2011
HSP60	Proteínas de estrés térmico codificadas por el gen <i>groEL</i>	Resistencia a diversos tipos de estrés abióticos, tales como acidez, alta temperatura y estrés osmótico.	Costa <i>et al.</i> , 2011 Pinto-Gomide <i>et al.</i> , 2018

En *C. pseudotuberculosis* se ha identificado un gen de transposasa en la PiCp1 lo cual es indicativo de la transferencia horizontal de genes, pudiendo ser esta la vía por la cual la bacteria adquiere sus genes de virulencia. Los ácidos corynomicólicos son componentes de la pared celular de la bacteria que están unidos a trehalosa en sus extremos más expuestos a la membrana plasmática, formando un entramado complejo que actúa como barrera que brinda protección e intercambio selectivo de moléculas. Esta estructura actúa como impedimento estérico protegiendo a la bacteria de la degradación causada por las lisozimas, limitando el acceso de estas enzimas hacia el peptidoglicano (Burkovski *et al.*, 2013; Burkovski *et al.*, 2018). Se ha demostrado que los ácidos corynomicólicos generan daño en

los órganos reproductivos de ovejas, con manifestaciones de congestión, degeneración y necrosis (Odhah *et al.*, 2018; Jesse *et al.*, 2019). Diversos ensayos que reproducen la infección de macrófagos ovinos con extractos lipídicos de *C. pseudotuberculosis*, indican que estas moléculas causan desordenes en la actividad metabólica, viabilidad e integridad de la membrana (Burskoski *et al.*, 2013; Burkovski *et al.*, 2018). Por otra parte se ha relacionado el aumento de las proteínas haptoglobina y el amiloide sérico, indicadores de infecciones en fase aguda, con la administración de ácidos corynomicólicos en ovejas (Odhah *et al.*, 2018). La fosfolipasa D (PLD) es considerada uno de los factores de virulencia más relevantes de *C. pseudotuberculosis*. Su acción enzimática es dependiente de Mg^{2+} , y actúa sobre la esfingomielina presente en las membranas celulares endoteliales. Esta exotoxina incrementa la permeabilidad vascular, favorece la propagación y resistencia de la bacteria en los fagocitos. Los fagocitos infectados transportan a la bacteria hacia los nódulos linfáticos donde se desarrollan los abscesos (Hodgson *et al.*, 1994; Baird y Fontaine, 2007; Li *et al.*, 2018b). No se considera que su acción sea directamente hemolítica, pero se ha reportado la producción de hemólisis sinérgica (Jost y Billington, 2004). La secuencia de aminoácidos de PLD esta conservada entre diferentes cepas y su modificación afecta en la bacteria su potencial de diseminación en el hospedero y pérdida de virulencia (Soares *et al.*, 2013).

El operón (fag ABCD) incluye genes relacionados con la adquisición de hierro, actividad que le confiere a la bacteria mayor capacidad de supervivencia en el hospedero (Schultz *et al.*, 2010; Sheldon y Heinrichs, 2015; Raynal, 2018).

La proteína CP40 es considerada un antígeno con potencialidades inmunogénicas contra la LAC (Walker *et al.*, 1994). El gen presenta un tamaño de 1,137 pb y se encuentra ubicado en la isla de patogenicidad PiCp1 (Ruiz *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 1994). Existen reportes que la describen como una enzima con actividad de proteasa serina (Walker *et al.*, 1995), mientras que otro análisis estableció su actividad de endoglicosidasa. La actividad de CP40 como factor de virulencia implica la capacidad de degradar la región glicosídica de anticuerpos IgG en ovinos y equinos (Shadnezhad *et al.*, 2016).

II. 4 Linfadenitis caseosa: patogénesis

La Linfadenitis caseosa es ocasionada por *C. pseudotuberculosis ovis*, afectando ovejas y cabras, con la formación de abscesos con diferentes tipos de exudados (seroso, sanguinolento, purulento, caseoso y sus combinaciones) en nódulos linfáticos y/o órganos internos (Dorella *et al.*, 2006). Existen dos presentaciones clínicas de la enfermedad, la aguda y la crónica. La manifestación cutánea aguda, implica el desarrollo de abscesos en nódulos linfáticos subcutáneos, los cuales son visibles y palpables a través de la piel y su localización depende del punto de entrada del microorganismo. Los abscesos se forman generando inflamación, se encapsula el material infeccioso, producen la caída del pelo en la zona afectada y eventualmente ocurre la ruptura liberándose el material purulento (Radostis *et al.*, 2000). En

la enfermedad visceral crónica, los abscesos se forman en los nódulos linfáticos internos y órganos como pulmones, hígado, bazo y los riñones, deteriorándose la salud del animal, con pérdida de peso y problemas reproductivos (Figura 2) (Odhah *et al.*, 2018; Faeza *et al.*, 2019; Jesse *et al.*, 2020).

La bacteria ingresa al hospedero generalmente por vía oro-nasal por contacto directo con partículas de polvo, suelo, alimento o heces contaminadas o vía cutánea producto de lesiones en la piel generadas durante la esquila, cortes de cola o marcaje de orejas, castración u otras actividades con objetos cortos punzantes contaminados. También puede ingresar a través de lesiones que se generan en la mucosa oral debido a la alimentación con forraje espinoso (Figura 2) (Dorella *et al.*, 2006). Otro factor que influye en la propagación de la infección lo constituye el manejo inadecuado de los equipos e instrumentos de trabajo, que pueden ser contaminados con el pus de los abscesos cutáneos. Este microorganismo puede sobrevivir en diferentes superficies y materiales como el suelo, la paja de la cama, el heno y los implementos de esquila por largos periodos de tiempos (de Farias *et al.*, 2019).

El periodo de incubación puede ser de semanas o meses, siendo inaparente tanto en ovejas como en cabras (Al-Gaabary *et al.*, 2009; Odhah *et al.* 2017; Odhah *et al.*, 2019). La diseminación bacteriana se desarrolla vía sanguínea y a través del sistema linfático, con la producción de abscesos en los nódulos linfáticos próximos al punto de ingreso de la bacteria. Los nódulos linfáticos parótidos, submandibulares, prefemorales, preescapulares, poplíteos o mamarios han sido asociados con la formación de lesiones abscedativas, siendo los mandibulares y preescapulares los más afectados de forma general (Al-Gaabary *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2015). La morfología característica de los abscesos en ovejas es conocida con aspecto de “capas de cebolla”, ya que se observan aros concéntricos compuestos por tejido conectivo que se forma para contener el material infeccioso intercalado con material necrótico purulento y exudado piogranulomatoso.

En cabras no es común encontrar esta morfología, por su parte los abscesos tienen aspecto pastoso y seco. La diferencia en cuanto a los abscesos en ambas especies está dada por las características de sus enzimas fagocíticas, las cuales presentan mayor actividad lítica en cabras. Los estudios de histopatología describen un cumulo de material eosinofílico en el interior de los abscesos, presencia de necrosis y linfocitos en la región más externa con células epitelioides y neutrófilos, rodeado por una red de fibroblastos (Baird y Fontaine, 2007). En cabras se han estudiado las modificaciones en el sistema reproductivo y nódulos linfáticos después de la inoculación experimental con *C. pseudotuberculosis* (Jesse *et al.*, 2020). La diseminación de la bacteria por el organismo ocasiona la producción de abscesos en nódulos linfáticos internos como los torácicos, bronquiales y mediastínicos, así como la afectación de órganos viscerales. En la manifestación cutánea se logra una evolución favorable en el hospedero si se libera el contenido purulento de los abscesos, adoptándose un estado crónico. Por otra parte en la manifestación visceral se afectan diferentes sistemas de

órganos con la formación de múltiples abscesos lo que puede conllevar a la muerte del animal (Dorella *et al.*, 2006).

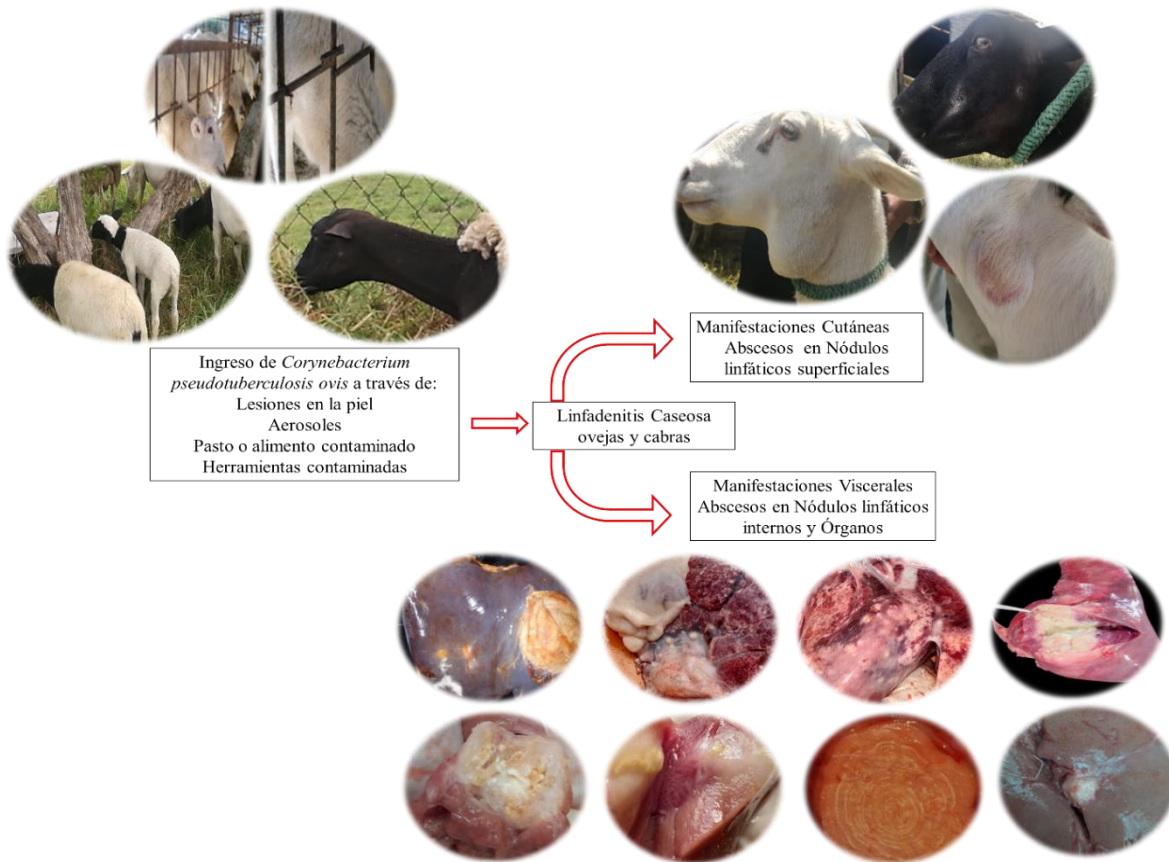


Figura 2. Manifestaciones patológicas de la Linfadenitis caseosa, formación de abscesos cutáneos y viscerales. Fuente original.

La LAC se presenta con mayor frecuencia en animales adultos (mayores de 1 año), por lo que existe una relación directa entre la edad y la prevalencia de la enfermedad (Chirino-Zarraga *et al.*, 2005; Al-Gaabary *et al.*, 2009). No obstante, también hay evidencias científicas sobre afectaciones en animales jóvenes, lo que denota especial interés en el estudio de esta enfermedad en estas poblaciones (Listos *et al.*, 2016).

La LAC conlleva al desarrollo de anemia, disminución en el conteo de neutrófilos, aumento de leucocitos, Interferón gamma (IFN- γ) e inmunoglobulinas (IgG) (Paule *et al.*, 2003; Rebouças *et al.*, 2011; Odhah *et al.*, 2017). La acción enzimática de la toxina PLD favorece la supervivencia de la bacteria en el interior de los macrófagos, debido a que esta actúa sobre la esfingomielina, ocasionando la ruptura de esta molécula, componente principal de las membranas celulares. Al ser fagocitada la bacteria por los macrófagos, la acción de la PLD

provoca la lisis de la membrana del fagolisosoma, quedando libre la bacteria en el citoplasma de la célula hospedera. Esta enzima puede causar reacciones de contracción celular, con incremento de la permeabilidad capilar, actuando en las células endoteliales cercanas al sitio de infección (Oliveira *et al.*, 2017a). La PLD favorece al desarrollo de la infección provocando la diseminación local y sistémica de la bacteria, con la formación de abscesos desde nódulos linfáticos superficiales a nódulos internos y órganos, con diseminación vía sistema linfático (Dorella *et al.*, 2006a; Baird y Fontaine, 2007). Además, esta toxina impide la quimiotaxis de los polimorfonucleares neutrófilos y la degranulación de células fagocíticas, activando el sistema complemento por la vía alternativa. También produce necrosis y trombosis de nódulos linfáticos, colaborando con la supervivencia y multiplicación de la bacteria (Aleman y Spier, 2001; McKean *et al.*, 2007). La ruptura de la célula hospedera permite la liberación de *C. pseudotuberculosis*, la cual se disemina vía hematógene hasta llegar a órganos donde forma abscesos en pulmones, bazo, hígado y riñones, principalmente (Estevao *et al.*, 2006; Mahmood *et al.*, 2015; Odhah *et al.*, 2019).

II.5 Sistema inmune

El sistema inmunológico comprende una variedad de células, tejidos y sustancias químicas que interactúan para superar infecciones, reparar daños tisulares y mantener la integridad del organismo. Los componentes celulares y moleculares encargados de la respuesta del sistema inmune actúan de manera integrada para lograr la defensa del organismo.

Las respuestas del sistema inmune pueden ser de tipo innata y adaptativa (Abbas *et al.*, 2022). La primera incluye mecanismos de defensa antigénicos inespecíficos que el organismo utiliza de forma inmediata al inicio de infecciones o daños. En esta etapa participan moléculas con actividad enzimática, péptidos antimicrobianos, proteínas del sistema complemento y la microbiota de las barreras anatómicas. También la inmunidad innata involucra a células de defensa que se activan producto al reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) (*por sus siglas del inglés*, Pathogen-associated molecular pattern) a través de la unión de estos a los receptores de reconocimiento de patrones o PRR. Las células que participan en este tipo de respuesta son los polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos, monocitos, macrófagos, células con capacidad fagocítica que secretan moléculas que favorecen la inflamación. Otras poblaciones celulares encargadas de este tipo de respuesta son los basófilos, eosinófilos y células asesinas naturales (células NK) (*por sus siglas del inglés*, Natural Killer) (Beutler, 2004).

La inmunidad adaptativa o específica es aquella que se adquiere producto a la exposición sucesiva a un mismo componente ya sea infeccioso, tóxico, externo o interno. Esta destaca por tres características fundamentales; primero la especificidad y diversidad, dada por la capacidad de responder de forma específica frente a diversos antígenos como proteínas, polisacáridos o cualquier otra macromolécula. Segundo el desarrollo de respuestas inmunes secundarias, donde el sistema responde otra vez ante el mismo antígeno previamente

analizado y procesado, siendo una respuesta más rápida, elevada y amplia en comparación con la primera. Por último la inmunidad adaptativa presenta la propiedad de tolerancia, lo que significa que es capaz de diferenciar entre lo ajeno y lo propio, eliminando componentes extraños sin reaccionar ante moléculas del organismo aunque estas sean similares entre sí (Phimister *et al.*, 2019).

Por otra parte, la inmunidad adaptativa se clasifica en humoral y celular. Los Linfocitos B (Linf B) son los responsables de la inmunidad humoral que se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas (Anticuerpos). Mientras que la inmunidad celular es mediada por el reconocimiento de antígenos por parte de los Linfocitos T (Linf T), lo cuales participan en la activación de otras poblaciones celulares como los Linfocitos T citotóxicos (LTC), macrófagos y células NK (Natoli y Ostuni, 2019).

En la médula ósea se originan los precursores de las células sanguíneas y del sistema inmune como resultado del proceso de hematopoyesis. En este proceso se genera una célula que es capaz de originar a todos los linajes de células sanguíneas como plaquetas, eritrocitos hasta linfocitos, esta es una célula madre pluripotente hematopoyética, que puede derivar en el linaje de células mieloides y el linaje de células linfoides (Khan y Ghazanfar, 2018).

Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) son derivados del linaje mielóide y son un grupo de células que tienen dos características principales en común; sus núcleos demuestran una amplia gama (poli) de diferentes formas (morfo) y todos tienen gránulos distintos en su citoplasma. La presencia de estos gránulos ha hecho que se les conozca como granulocitos, células que tienen tanto gránulos como núcleo lobulado típico y representan entre el 60 - 70 % de los glóbulos blancos del organismo. Los diferentes tipos de PMN son: los neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

Polimorfonucleares Neutrófilos: Miden de 10 a 20 μm , constituyen aproximadamente el 90 % de los granulocitos y presentan un tiempo de vida corto, de horas en condiciones normales hasta días en presencia de infecciones (Wang *et al.*, 2017). Su denominación se origina de la capacidad de mantenerse de color neutro ante tinciones con colorantes ácidos o básicos, siendo el citoplasma de color rosa claro en las observaciones al microscopio. En el núcleo se puede observar la cromatina compacta y segmentada, presentando múltiples lóbulos 2-5 conectados por delgados puentes. Son células de consistencia gelatinosa lo que les permite actuar rápido ante respuestas inflamatorias, pasando a través de los vasos sanguíneos para migrar hacia los tejidos afectados donde proceden a eliminar a los patógenos. Cuando hay daño tisular local debido a la presencia de algún trauma o infección, los polimorfonucleares neutrófilos se activan y emigran desde los capilares y las vénulas poscapilares hacia los tejidos como respuesta a gradientes de sustancias químicas conocidas como quimiotaxinas y quimiocinas (citocinas quimiotácticas). Esta migración dirigida se conoce como quimiotaxis. Durante este proceso, las células pueden descargar el contenido de sus gránulos (degranulación) afectando a las células cercanas o a las bacterias extracelulares, aumentando algunos eventos asociados a la membrana celular (como quimiotaxis y el estallido

respiratorio) y el aumento de la expresión de proteínas de membrana (Liew y Kubes, 2019). En los vasos principales estas células están en constante flujo, sin embargo en los lechos capilares estas células se vuelven temporalmente estacionarias. Las moléculas de heparán-sulfato forman parte del glicocáliz que recubre las células endoteliales y sirven como anclajes para las quimiocinas liberadas por los polimorfonucleares neutrófilos, evitando que el flujo de la sangre elimine estas células. También se ha sugerido que las células endoteliales transportan quimiocinas en sentido basolateral a apical a través del heparán sulfato (Wang *et al.*, 2005; Massena *et al.*, 2010). El citoplasma de estas células contiene abundantes gránulos se tiñen de color rojo (teñidos con el colorante Giemsa) y están especializados en producir enzimas líticas y fagocitina. Los gránulos de los polimorfonucleares neutrófilos se pueden clasificar en primarios (azurófilos) gránulos (lisosomas), que contienen hidrolasas ácidas, mieloperoxidasa y lisozima; los gránulos secundarios (específicos) que contienen lactoferrina y lisozima pero carecen de mieloperoxidasa y los gránulos terciarios que contienen gelatinasa y vesículas secretoras, que actúan como almacenes intracelulares de moléculas que generalmente se encuentran ancladas en la membrana celular donde actúan como receptores de otras moléculas. Los polimorfonucleares neutrófilos participan en la respuesta inmune innata, siendo parte de las defensas primarias del organismo ante los patógenos. Estos contienen un repertorio de efectores antimicrobianos que incluyen la fagocitosis, la degranulación y la formación de trampa extracelular de polimorfonucleares neutrófilos (Silvestre-Roig *et al.*, 2019; Liew y Kubes, 2019). Estas células liberan opsoninas que se unen a los respectivos receptor opsónico como los receptores Fc, lectinas tipo C o receptores del complemento, señales que activan en los polimorfonucleares neutrófilos el proceso de fagocitosis. Esto está mediado por proteínas de membrana y señalización intracelular en cascadas junto con reordenamientos citoesqueléticos. La fagocitosis es rápida y ocurre en cuestión de minutos y es potenciada en presencia del sistema del complemento o anticuerpos. Durante este proceso, los gránulos primarios y secundarios se fusionan con el fagosoma y liberan contenidos antimicrobianos para la eliminación del patógeno o célula dañada (Liew y Kubes, 2019).

Polimorfonucleares eosinófilos: Los polimorfonucleares eosinófilos miden unos 8 μm de diámetro, comprenden el 4 % de los glóbulos blancos de la sangre y su vida útil es de unos 13 días. La diferenciación de precursores en la médula ósea está influenciada por la citocina interleucina 3 (IL-3) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, (GM-CSF). Además, la interleucina 5 (IL-5) promueve específicamente la expansión del número de polimorfonucleares eosinófilos (y polimorfonucleares basófilos). Los polimorfonucleares eosinófilos de las reservas de la médula ósea son promovidos tanto por IL-5 como por la quimiocina conocida como eotaxina. Al igual que los polimorfonucleares neutrófilos, contienen gránulos intracelulares, siendo los gránulos primarios abundantes en la proteína cristalina de Charcot-Leiden y los gránulos secundarios contienen un núcleo cristalino de proteína básica principal (MBP) y una matriz de proteína catiónica de polimorfonucleares

eosinófilos (ECP), neurotoxina derivada de polimorfonucleares eosinófilos (EDN) y peroxidasa de polimorfonucleares eosinófilos (EPO). Estas células también contienen cuerpos lipídicos que son el sitio de síntesis de mediadores lipídicos. Además, expresan citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 que pueden mejorar o disminuir su propia función (acción autocrina) o la de otras células (acción paracrina). Los polimorfonucleares eosinófilos sintetizan prostaglandinas y leucotrienos a partir de los componentes lipídicos de la membrana celular. La activación de los polimorfonucleares eosinófilos depende de la adhesión, pero también de la carga eléctrica (Liew y Kubes, 2019).

Polimorfonucleares basófilos y Mastocitos: Tanto los mastocitos como los polimorfonucleares basófilos se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Sus células progenitoras aumentan en número a través de la acción de la IL-3. La diferenciación hacia polimorfonucleares basófilos completos tiene lugar bajo la influencia de IL-3 y el factor de crecimiento transformante de citoquinas b (TGFb). La diferenciación de los mastocitos es producto a la presencia del factor de células madre (SCF). Salen de la médula ósea como precursores y después de migrar a los tejidos, proliferan y se diferencian en mastocitos maduros (Liew y Kubes, 2019). Como otros granulocitos, el núcleo del basófilo circulante está profundamente lobulado. Sin embargo, los de los mastocitos en los tejidos son redondeados. Los polimorfonucleares basófilos se encuentran en gran medida en la circulación, pero ingresan a los tejidos en respuesta a la liberación de quimiotaxinas y quimiocinas durante la inflamación. Ambos tipos de células desempeñan un papel en las reacciones alérgicas, la inflamación y las respuestas del hospedero ante infecciones parasitarias, cáncer, generación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y remodelación de tejidos (Voehringer *et al.*, 2013). Son las únicas células en cuyas membranas hay grandes cantidades de un receptor de alta afinidad por inmunoglobulina E (IgE), estos receptores son expresados de forma constitutiva y almacenan histamina en su sistema secretor de gránulos (Liew y Kubes, 2019; Passante, 2020).

Monocitos y macrófagos: Los monocitos también derivan del linaje mieloide de la médula ósea, representando entre un 5 - 10% de las células blancas que circulan en sangre, donde permanecen alrededor de 24-48 horas y luego pasan a los tejidos donde se diferencian en macrófagos (Jakubzick *et al.*, 2017; Nielsen *et al.*, 2020). Estas células son fenotípica y funcionalmente diferentes en relación con el tejido en el que residen, por ejemplo son denominados células de Kupffer en el hígado, macrófagos alveolares en pulmones, en la microglía del cerebro son macrófagos residentes, osteoclastos en el hueso, y otros macrófagos que revisten los canales en el bazo y nódulos linfáticos.

Esta red de células relacionadas constituyen el sistema fagocítico mononuclear (MPS) e incluye aquellas células en las primeras etapas de desarrollo (monoblastos y promonocitos), así como monocitos y macrófagos. Los macrófagos pueden ser categorizados según su etapa de desarrollo y su estado de activación (Liew y Kubes, 2019). Además de su capacidad para fagocitar y eliminar microorganismos, también secretar una amplia gama de sustancias

químicas implicadas en la inflamación y la coagulación de la sangre. Desempeñan un rol fundamental en la estimulación de la respuesta inmune adaptativa ante moléculas extrañas específicas, y participan en la presentación de antígenos. El CD14 se describió como un antígeno de la superficie de diferenciación de monocitos/macrófagos (Landmann *et al.*, 2000). Esta molécula se presenta de dos formas, una como proteína monomérica de una talla de 52-55 kDa unida a la membrana celular a través de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (CD14m) o como una proteína soluble secretada en el suero de peso molecular de 48–56 kDa (CD14s) que permite que las células epiteliales y endoteliales respondan ante ligandos de patógenos como los PAMP (Vives-Pi *et al.*, 2003) o moléculas asociadas a daños DAMPs (*por sus siglas en inglés*, Damage-associated molecular patterns) (Zanoni *et al.*, 2017). Estudios previos indican que los macrófagos de ratones CD14^{+/+} de tipo salvaje reconocen el LPS suave en concentraciones picomolares más bajas que el LPS rugoso. Mientras que los macrófagos CD14^{-/-} no demuestran una preferencia significativa por el LPS liso o rugoso, pero tienen una reducción de 150.000 veces en la sensibilidad general a producir TNF- α ante el estímulo originado por LPS (Gangloff *et al.*, 2005).

Células Dendríticas (DC) (*por sus siglas del inglés*, Dendritic cells): Estas células son responsables de iniciar la respuesta inmune adaptativa y funcionan como centinelas del sistema inmunológico. Tienen forma irregular y se extruyen y retraen activamente en forma de hilos, "como dedos" del citoplasma y la membrana celular circundante. Son localizadas en casi todos los tejidos del organismo y su etapa de maduración puede variar según su ubicación. En los nódulos linfáticos son denominadas células interdigitantes cuando se localizan cercana a las regiones de activación T dependiente. En los centros germinales de los folículos secundarios en nódulos linfáticos y bazo, son conocidas como células dendríticas foliculares que participan en la activación de Linf B. También se pueden detectar en la región medular del Timo. Se clasifican en DC1, las cuales se encuentran tanto en tejido linfóide como no linfóide y expresan elevados niveles del receptor 1 de quimiocina X-C (XCR1). En la presentación de antígeno en el contexto de DC1, las células T CD8⁺ secretan abundantes cantidades de ligando 1 de quimiocina XC (XCL1) lo que facilita la diferenciación de células T citotóxicas efectoras. DC1 también expresa altos niveles de genes que son críticos para la vía MHC-I. El subconjunto DC2 expresa los mismos niveles de CD11c y MHC clase II en comparación con DC1; sin embargo, expresan niveles generalmente más altos de CD4, CD11b y Sirpa, y no expresan marcadores DC1, como DNGR-1, XCR1, y CD8a. En términos de funciones, las DC2 son importantes para presentar antígenos solubles a las células T CD4⁺ y la iniciación del sistema inmunológico Th2 (Lee y Suresh, 2022).

Las DC están especializadas en la acción de captar y procesar antígenos presentes en sangre periférica y tejidos. Una vez captado el antígeno migran hacia los nódulos linfáticos donde ocurre la presentación de los antígenos a los linfocitos, participando activamente en la respuesta inmune adaptativa. Cuando las células dendríticas migran desde los tejidos

periféricos hacia el sitio de infección o daño, experimentan una maduración fenotípica y funcional. La identificación de las DC es difícil debido a que carecen de un marcador en la membrana que sea único para esta población celular. Estas expresan abundante MHC clase II, carecen de marcador del linaje de monocitos como CD14, CD3 que es específico de Linf T, CD19, CD20 y CD24 que están presentes en Linf B, CD56 que se utiliza para células NK y CD56b de granulocitos. Comparten marcadores de adhesión con monocitos y macrófagos (CD11a, CD11c, CD50, CD54, CD58, CD102) y moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86). Son células que varían su fenotipo según su grado de maduración y activación, por ejemplo cuando se encuentran circulando en sangre presentan CD2, CD4, CD13, CD16, CD32 y CD33 y estas moléculas se dejan de expresar en la medida que va madurando la célula. Las DCs localizadas en tejido no linfóide presentan un fenotipo CD103⁻ CD11b⁺ o CD103⁺ CD11b⁻. Las DC migratorias internalizan antígenos y migran hacia el nódulo linfático para realizar una presentación cruzada a Linf T. Por otra parte, la DC de fenotipo CD8a⁺ CD11b⁻ o CD8⁻ CD11b⁺ se encuentran en nódulos linfáticos y el bazo (DC residentes) (Lee y Suresh, 2022).

Las moléculas CD80 y CD86 aumentan su expresión con la activación, luego del reconocimiento de CD40 con su ligando. La molécula CD86 constituye un indicador de maduración que se puede detectar al inicio del proceso, mientras CD80 no se encuentra en las células circulantes y aparece de forma tardía en la maduración. Lo más notable es que dejan de capturar antígenos mientras regulan positivamente la expresión de CD80 y CD86 y el receptor de quimiocina CCR7, y secretan citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-12. Cuando llegan al seno subcapsular del nódulo linfático se dirigen a la región de Linf T, donde participan activamente en la presentación de antígenos hacia esta población celular (Zanna *et al.*, 2021).

La respuesta inmune específica o adaptativa depende de la actividad de un grupo particular de células, los linfocitos. El linaje de células linfoides procedentes de la médula ósea es el precursor de los linfocitos B y T. Los linfocitos conforman aproximadamente el 20 % de los glóbulos blancos y derivan su nombre por su fuerte asociación con el sistema linfático. Miden entre 6 y 10 μ m de diámetro y tienen un núcleo grande, casi esférico, rodeado por un halo de citoplasma muy pequeño e indistinto. Estos se caracterizan por reconocer de forma específica los componentes moleculares que serán analizados por el sistema inmune. Tras la estimulación, algunos linfocitos se vuelven efectores, células que realizan funciones diseñadas para eliminar el antígeno o patógeno. Otras se diferencian a células de memoria de larga duración que pueden persistir durante años y permitir una recuperación más rápida (Chang *et al.*, 2014; Ratajczak *et al.*, 2018).

Los linfocitos son de tipos T y B, y aunque derivan de un progenitor común en la médula ósea, están condicionados o sensibilizados por el Timo o la Médula Ósea respectivamente, antes de que se vuelvan activos. La función de cada subtipo es diferente y se pueden identificar por marcadores específicos de tipo glicoproteicos en su superficie celular.

Los linfocitos B (Linf B): Estas células realizan el proceso de diferenciación en la médula ósea antes de ser liberadas, y se sugiere que la acción de la IL-7 y la expresión del gen *pax5* podrían favorecer las etapas iniciales de diferenciación de las células B. El receptor de IL-7 (IL-7R) es un heterodímero de transmembrana compuesto por la cadena α de IL-7R específica del ligando (IL-7R α) y la cadena gamma común compartida (γ c), una proteína transmembrana de paso único compartida por varios receptores de citocinas. Cuando este se agrega a las cultivos que contiene precursores tempranos de células B, la IL-7 confiere tanto supervivencia como proliferación de esta población celular (Allman *et al.*, 2003).

El papel de los Linf B se desarrolla a través de la interacción de sus receptores celulares inmunoglobulinas (IgG) o anticuerpos (Ac), los cuales actúan como el receptor de células B (BCR) (*por sus siglas del inglés*, B cell Receptor) para internalizar, procesar y presentar el antígeno a células T. Los Linf B se diferencian en células plasmáticas, las cuales se especializan en la producción de Ac solubles. Los Ac se producen en Linf B activados y ejercen diversas funciones: son potenciadores de la respuesta innata, neutralizan antígenos, son activadores del sistema complemento, realizan la opsonización para la fagocitosis, median la respuesta dependiente de células citotóxicas NK entre otras funciones (Khan y Ghazanfar, 2018). La molécula CD19 (B4) es una proteína de la superficie celular de los Linf B que se expresa temprano durante la diferenciación de células pre-B y persiste hasta la diferenciación terminal en células plasmáticas. Esta molécula es utilizada para la identificación de las poblaciones celulares de Linf B.

Los linfocitos T (Linf T): Consisten en células cuya maduración y activación ocurre fuera de la médula ósea, específicamente en el Timo. Los Linf T vírgenes o LT⁰ luego de establecer contacto con los antígenos pueden diferenciarse en células T cooperadoras (Th) (*por sus siglas del inglés*, T helper) o T citotóxicas (Tc) (Khan y Ghazanfar, 2018). Un determinado conjunto de células T maduras y diferenciadas puede vivir durante periodos de tiempo más prolongados y proporcionar una respuesta más rápida cuando el organismo se enfrenta a la misma molécula otra vez. Estas células que se dedican a recordar los antígenos que las activaron y que dispararon su diferenciación se conocen como células T de memoria.

La molécula CD3 comprende un complejo polipeptídico que se encuentra anclado en la membrana de los Linf T y que puede estar compuesto por cinco cadenas polipeptídicas invariables conocidas como γ , ϵ , δ , ζ y η ; estas cadenas se asocian entre ellas para formar tres estructuras diméricas: el heterodímero $\gamma\epsilon$, el heterodímero $\delta\epsilon$ y el homodímero $\zeta\zeta$ o el heterodímero $\zeta\eta$ (Ryan, 2010). El 90% de los complejos CD3 poseen el homodímero $\zeta\zeta$, mientras que el heterodímero $\zeta\eta$ ha sido encontrado solo en el 10% remanente. Las cadenas peptídicas del complejo CD3 tienen un segmento transmembranal que posee un ácido aspártico o ácido glutámico (residuos cargados negativamente), capaces de interactuar con las cargas positivas de los aminoácidos en la porción transmembranal del complejo receptor de antígeno de células T (TCR) (*por sus siglas en inglés*, T cell Receptor), participando activamente en el reconocimiento de antígenos presentados al TCR (Menon *et al.*, 2023). El

TCR no se expresa en células T deficientes de CD3, y por ello este último es empleado como marcador de células T viables para el reconocimiento antigénico (Garcillán *et al.*, 2022).

Los Linf T solo pueden reconocer antígenos peptídicos unidos a otras moléculas conocidas como Complejo mayor de histocompatibilidad o MHC (*por sus siglas del inglés*, Major Histocompatibility Complex) y a esto se le llama “restricción por MHC”. Los genes que codifican para las moléculas de MHC presentan un elevado grado de polimorfismo, lo que significa que hay gran variedad en estos genes en los individuos de una población, donde cada individuo tiene su conjunto de alelos propios. Como consecuencia de esta variabilidad en los genes del MHC, cada individuo puede reconocer una gran diversidad de péptidos, secuencias y variedad de antígenos en cada infección. Los Linf T inactivos, en el Timo (timocitos) están en un periodo de senescencia mitótica, no se dividen activamente y están detenidas en la fase G0 del ciclo celular. Su activación tiene lugar a través de la participación de las células conocidas como células presentadoras de antígenos o APC (*por sus siglas del inglés*, Antigen Presenting Cells). Las APC tienen la función de presentar los antígenos unidos a las proteínas del MHC que son reconocidas selectivamente por los TCR de la membrana de los Linf T (Abbas *et al.*, 2022).

Linfocitos T CD4⁺: Los Linf T que presentan en su membrana la molécula CD4 son identificados como células Th, encargadas del reconocimiento de antígenos externos y la activación de elementos de la respuesta inmune mediada por células. Estas células CD4⁺ reconocen antígenos que son presentados por el receptor MHC de tipo II (Abbas *et al.*, 2022). Las moléculas MHC-II solo están presentes en las células presentadoras de antígenos APCs, como las células dendríticas (DCs), macrófagos y Linf B. En presencia de IFN- γ el MHC-II también se expresa en células estromales mesenquimales, fibroblastos, células endoteliales, así como en células del epitelio y células gliales entéricas. Las moléculas MHC-II presentan péptidos (10-30aa) que pertenecen a patógenos extracelulares. Estas moléculas están conformadas por una cadena α y una β que se unen en el retículo endoplasmático (RE) y se estabilizan con la cadena invariante (li) (Figura 3A). La unión del MHC-II y li pasa del aparato de Golgi hacia el compartimiento de MHC de clase II (MIIC) (Dileepan *et al.*, 2021). Luego las enzimas cathepsina S y L en condiciones de pH ácido, digieren li generando un péptido li residual asociado (CLIP) en la región de unión de la molécula de MHC-II. Más tarde, la acción de chaperonas median el intercambio entre CLIP y el péptido antigénico, seguido de su transporte hacia la membrana celular donde quedara expuesto el péptido en unión a la molécula MHC-II, listo para interactuar con los TCR de las células T CD4⁺ (Figura 3A). La interacción entre el receptor TCR (en la superficie de la célula T CD4⁺) y el antígeno unido a la MHC de clase II (en la superficie de la célula APC) forma un complejo que asegura el reconocimiento específico (Figura 3B). La diferenciación de una célula T implica el reordenamiento aleatorio de los genes especializados en la presentación de antígenos, se tienen cientos de poblaciones diferentes de células capaces de reconocer diferentes partes del mismo antígeno o antígenos distintos (Luckheeram *et al.*, 2012).

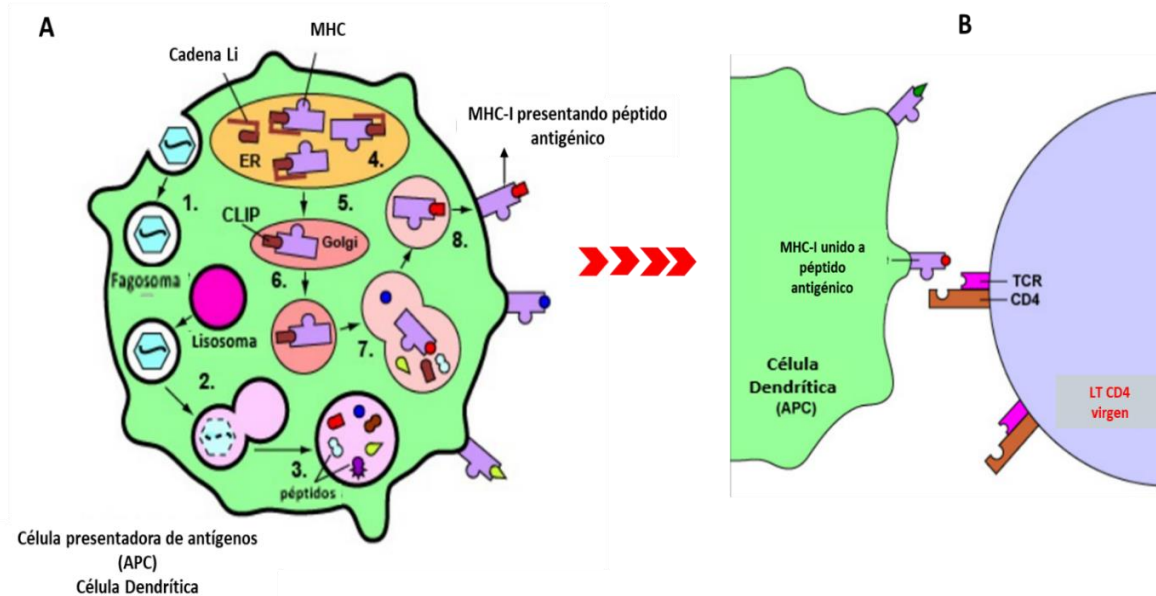


Figura 3. Presentación de antígenos y activación de linfocitos T CD4⁺ en el contexto del MHC-II. **A.** Procesamiento de antígenos extracelulares mediado por células dendríticas (APC profesionales). Paso 1: Formación del fagosoma. Paso 2: Fusión de fagosoma con el lisosoma, lisis del microorganismo y liberación en el citoplasma. Paso 3: Degradación mediada por proteosomas citosólicos y nucleares que generan péptidos. Paso 4: Complejos de cadenas α y β de la molécula MHC que se unen en el retículo endoplasmático (RE) y se estabilizan con la cadena invariante (Li). Paso 5: El complejo de MHC-II y Li es transportado desde el aparato de Golgi hasta un compartimiento denominado compartimiento de MHC de clase II. Paso 6: Degradación del péptido Li, formación del péptido li residual asociado (CLIP). Paso 7: Intercambio entre CLIP y el péptido antigénico. Paso 8: Transporte del complejo MHC-II y el péptido hasta la membrana celular. **B.** Presentación de péptidos antígenicos en el contexto MHC-II a las células T CD4⁺ vírgenes. Figura modificada de Kaiser, 2024.

Una vez que se reconoce el antígeno presentado en el contexto del MHC-II, tanto el Linf T CD4⁺ como la célula APC comienzan a secretar citoquinas que contribuyen a la activación del linfocito. Cuando el linfocito es activado se multiplica, formando nuevas células idénticas, específicas para el antígeno en cuestión y que se encuentra en estado ingenuo o naïve (Th0), que no se modifica hasta tanto se encuentren con el antígeno para el cual fueron diseñados (Figura 3B).

A partir de un linfocito precursor Th0 se pueden originar células Th1 o Th2, lo cual va a depender del perfil de citoquinas secretadas, ya que morfológicamente no hay diferencias

visibles. La presencia de IL-12 estimula la proliferación del fenotipo Th1 (Trinchieri *et al.*, 2003), quien a su vez secreta citocinas como el interferón gamma (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral (TNF) que estimulan una variedad de células que conduce a la inmunidad mediada por células; estas pueden estimular la proliferación de macrófagos y células T citotóxicas (Rushdi *et al.*, 2022).

Por otra parte IL-2 e IL-4 participan en el desarrollo de Th2, a su vez estas células secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que inducen la respuesta inmune humoral e influyen en la clase de inmunoglobulina que será producida por las células B. También existen las células Th3 las cuales están involucradas en la regulación de la respuesta inmune y en el cambio de fenotipo de las células T en función del patrón de citoquinas liberadas (Wertheim, 2021).

Linfocitos T CD8⁺: Los Linf T CD8⁺ también son conocidos como Linfocitos T citotóxicos (LTc), tienen actividad ante patógenos intracelulares y antitumoral. Los Linf T CD8⁺ reconocen antígenos que son presentados por células a través del receptor MHC tipo I. Todas las células nucleadas son capaces de expresar las moléculas de MHC-I, estas se conforman por una cadena pesada variable y una de β 2-microglobulina que se ensamblan en el retículo endoplásmico (RE) (Wang y Alexander, 2009). Las chaperonas calreticulina, Erp57, proteína disulfuro isomerasa (PDI) y tapasina se mantienen unidas a la molécula de MHC-I para su estabilización en tanto no exista péptido antigénico unido a ella. Ese complejo proteico se denomina complejo de carga del péptido. La tapasina interacciona con la proteína de transporte TAP (transportador asociado con la presentación de antígeno), permitiendo el transporte del péptido desde el citoplasma al RE. Previamente las moléculas virales, bacterianas, extrañas o propias son degradadas para la generación de los péptidos antigénicos. En el proceso de degradación intervienen proteasomas citosólicos y nucleares que generan péptidos que pueden translocarse al RE a través de TAP. El tamaño de los péptidos que son transportados por TAP es de 8-16 aminoácidos y estos sufren otras modificaciones por la acción de aminopeptidasas asociadas con la presentación de antígenos antes de ser unidos al MHC-I. Una vez formado el complejo péptido-MHC-I, las chaperonas se separan y el complejo sale del RE para exponerse en la membrana celular. No siempre el mecanismo de unión es eficiente y en dado caso los péptidos que no se une regresan al citoplasma para nuevamente ser degradados. Los sistemas proteosomas encargados de degradar y generar los péptidos de unión al MHC-I son el proteosoma 26S (presente en todas las células), el inmunoproteosoma (solo se expresa en algunas células del sistema inmune) y el proteosoma específico del Timo (localizado en las células del epitelio del Timo) (Figura 4A). Para la presentación de antígenos no es suficiente la interacción entre el receptor de célula T y el péptido unido a la molécula MHC-I, también se requiere de la unión de la molécula CD8⁺ presente en la membrana del Linf T con las regiones de unión libre de la molécula MHC-I. Es por este mecanismo que el péptido presentado por un MHC-I solo puede ser reconocido por los linfocitos T que contengan CD8⁺ en su membrana celular (Figura 4B). Se requieren tres señales para la activación de los LT CD8: La primera corresponde con la presentación

del péptido en el complejo MHC-I (anteriormente descrito), la segunda es la interacción entre CD80/86 de la APC y CD28 en la superficie de la célula T, y la tercera corresponde con la expresión de citocinas por parte de las APC, lo que resulta en la activación completa de la célula T para producir una respuesta específica (Abbas *et al.*, 2022).

Una vez activada la célula T CD8⁺ a un fenotipo LTc puede unirse a la célula blanco infectada e introducir perforinas al igual que las células NK (Figura. 4 C-D). A través de los poros de las células T pueden salir granzimas hacia el citoplasma de la célula blanco, lo cual hace que se activen caspasas involucradas en la degradación del ADN e inducción de apoptosis en la célula infectada o dañada. Las células T citotóxicas también pueden unirse moléculas Fas de la célula problema e inducir por esta otra vía la apoptosis.

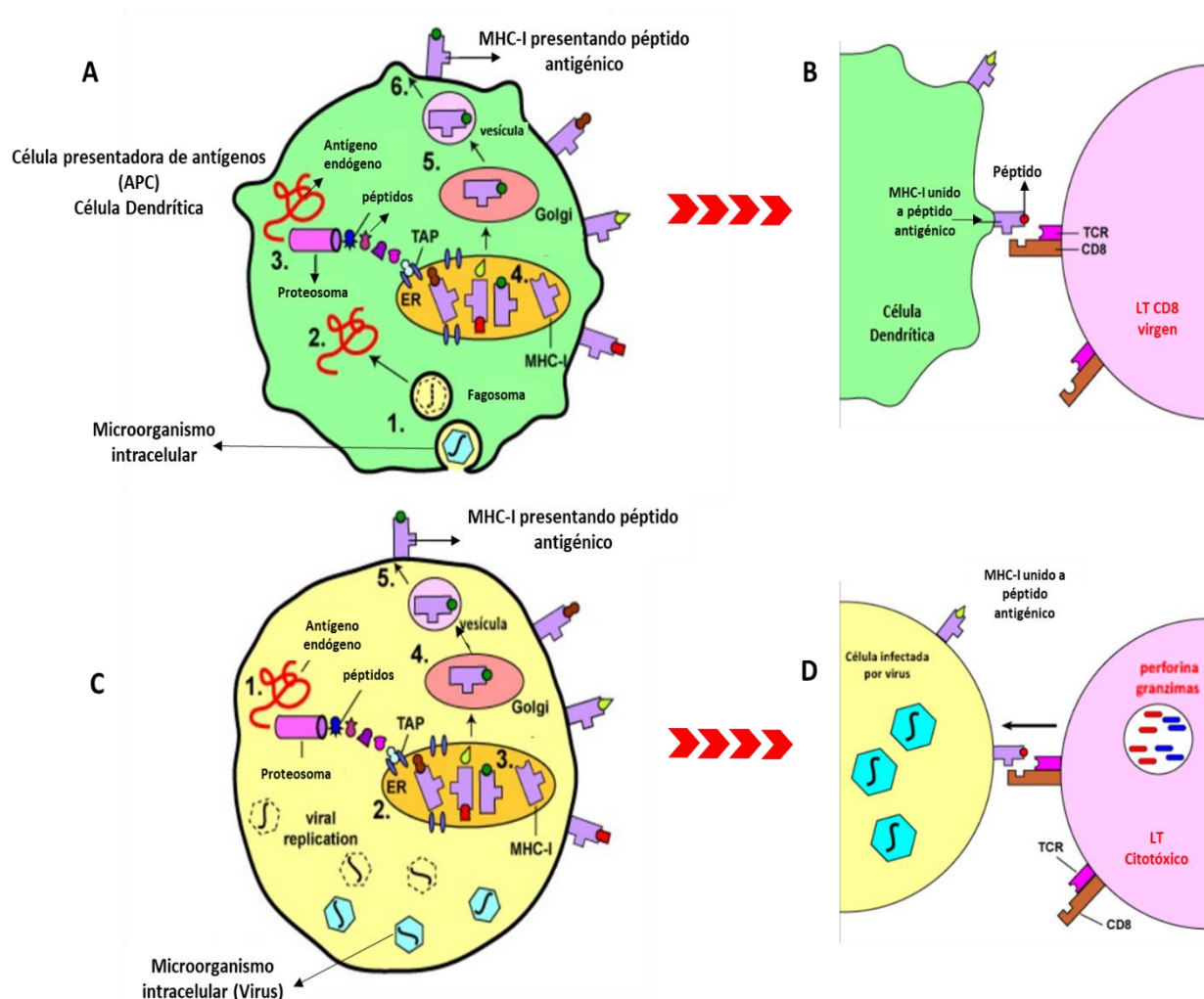


Figura 4. Presentación de antígenos y activación de linfocitos T CD8⁺ en el contexto del MHC-I. **A.** Procesamiento de antígenos intracelulares mediado por células dendríticas (APC

profesionales). Paso 1: Formación del fagolisosoma. Paso 2: Lisis del microorganismo y liberación en el citoplasma. Paso 3: Degradación mediada por proteosomas citosólicos y nucleares que generan péptidos. Paso 4: El complejo de carga del péptido interactúa con la proteína de transporte TAP (transportador asociado con la presentación de antígeno), lo que permite la translocación del péptido desde el citoplasma al RE. Paso 5: Transporte de los péptidos a través del complejo de Golgi. Paso 6: Presentación del complejo MHC-I unido al péptido antigénico en la membrana citoplasmática de la célula APC. **B.** Presentación de péptidos antigénicos en el contexto MHC-I a las células T CD8⁺ vírgenes. **C.** Procesamiento de antígenos de patógenos intracelulares, ejemplo virus, mediado por células infectadas. **D.** Reconocimiento antigénico y activación de células T CD8⁺ citotóxicas, para la eliminación de células infectadas con patógenos intracelulares. Figura modificada de Kaiser, 2024.

Las células Tc0 también pueden diferenciarse hacia fenotipos Tc1 y Tc2 en dependencia del perfil de citocinas que es secretado. Estos subtipos responden ante un conjunto escaso de citocinas y su función aún no está bien definida. Por otra parte, puede que algunas poblaciones de Linf T CD8⁺ tengan función supresora mediando la desregulación de las respuestas de linfocitos (Aryal, 2021).

Linfocitos granulares grandes: Los linfocitos granulares grandes (LGL) son un conjunto de diferentes subpoblaciones de células que desempeñan un papel que limita entre la inmunidad innata y la específica. Estas células comprenden aproximadamente el 4% de los glóbulos blancos, son grandes, redondas y con abundante citoplasma. El citoplasma es granular, pero los gránulos son pequeños en comparación con los encontrados en las células dendríticas. Un ejemplo de estas células lo constituyen las células asesinas naturales (NK), especializadas en destruir células objetivo mediante la acción de moléculas conocidas como perforinas y granzimas (Chau-Ching *et al.*, 1998). Las células “natural killer” (NK) se nombran en función de su capacidad de eliminar células infectadas, dañadas o tumorales. Para ejercer su función estas células no requieren de instrucción previa, de ahí proviene la terminología “natural”. La NK presenta un citoplasma granular y glicoproteínas específicas en la superficie celular. Se ha caracterizado una población que presenta ambas características de células T y NK, denominadas células NKT.

Otros de los componentes fundamentales del sistema inmune son las Citoquinas, pequeños péptidos solubles que influyen en la diferenciación de las células y en su acción. Las citoquinas actúan a través de su unión con receptores específicos localizados en membranas celulares o solubles en sangre. Estas moléculas son capaces de regular la expresión de los receptores y aumentar la expresión de ellas mismas. Los receptores se clasifican en clase I como los de interferón y clase II para las citoquinas como IL-2 e IL-4 (Furman y Davis, 2015).

Generalmente las citoquinas actúan de forma soluble, pero existen algunas que requieren unión a membrana, lo que dificulta poder diferenciar entre el receptor y la citoquina. Estas moléculas realizan funciones variadas en dependencia del tipo de citoquina y de la célula

involucrada. Sus acciones influyen en la activación celular, división, apoptosis, así como tienen función autocrina, parácrina o endócrina. Las citoquinas liberadas por los leucocitos cuyo efecto se ejerce sobre otras células blancas son llamadas interleucinas. Por otra parte aquellas que tienen actividad quimioatrayente son llamadas quimiocinas, mientras que las encargadas de diferenciación y proliferación de células madre son llamadas factor estimulador de colonias. Las que participan ante infecciones causadas por virus, parásitos o bacterias intracelulares son llamadas interferones. Las células Th1 generalmente expresan interleucina 2 (IL-2), interferón γ (IFN- γ) y la linfotoxina (LT). Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. También las células Th1 y Th2, pueden producir otras citoquina como la IL-3, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Abbas *et al.*, 2022).

Los interferones se clasifican como tipo 1 (interferones α y β) y tipo 2 (γ o interferón inmune), siendo los primeros activados durante infecciones virales y liberados por fibroblastos y monocitos. Tanto el interferón α como el β utilizan el mismo receptor celular y protegen a las células que no están infectadas induciendo la producción intercelular de moléculas que inhiben o interfieren con la producción de ARN y ADN viral. La presencia de esta citoquina aumenta la expresión de moléculas MHC-I, lo que favorece que las células infectadas sean reconocidas por los LTc (Parkin y Cohen 2001).

El factor de necrosis tumoral (TNF, también conocido como TNF- α) es una glicoproteína que se encuentra implicada en procesos inflamatorios e infecciosos, donde induce diferenciación y proliferación celular. El papel que desempeñan estas moléculas se ha evaluado mediante el uso de anticuerpos anti-TNF o la adición de receptores de TNF solubles (RTNF) en el control de la artritis reumatoide y otras condiciones inflamatorias. Son producidas por monocitos/macrófagos, mastocitos, Linf T y B, células NK, polimorfonucleares neutrófilos, células endoteliales, las células del músculo cardíaco, fibroblastos y osteoclastos (Bradley, 2008).

La IL-4 es un polipéptido de 15 kDa, con función inmunomoduladora y expresión en células diferentes por ejemplo, las células T circulantes vs células cebadas de los tejidos. Esta molécula participa activamente en la inmunidad protectora, así como en enfermedades inflamatorias. En los Linf T al unirse la IL-4 a su receptor se induce la proliferación y diferenciación hacia células Th2. Pueden estar involucradas en procesos de regulación y prevención de la autoinmunidad mediante la desregulación de las células Th1 pero aún no se ha descrito el mecanismo de acción (Keegan *et al.*, 2021).

La IL-10 es una proteína que pertenece a la familia de clase II de las citoquinas de α hélice, que está compuesta por los interferones de tipo I: interferón γ e IL-10. Los macrófagos activados, las células dendríticas, los Linf B y los Linf T CD4⁺, Linf T CD8⁺ son capaces de producir esta citoquina (Ouyang y O'Garra, 2019). La IL-10 puede modular la diferenciación de las células dendríticas derivadas de monocitos, la inducción de la apoptosis en células dendríticas plasmacitoides, y la migración de las células dendríticas mediante la modulación

de la expresión de superficie de receptores de quimiocinas. También afecta directamente a la función de las células T CD4⁺ mediante la inhibición de la expresión de la IL-2, el TNF, IL-5 y el receptor de quimiocinas CXCR4 (O'Garra, 2010).

II.6 Respuesta inmune frente a *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*

C. pseudotuberculosis ovis es un patógeno intracelular facultativo que presenta diversos mecanismos de evasión de la respuesta del sistema inmune del hospedero, por lo que es difícil su eliminación una vez que se instaura la infección. Los piogranulomas son las lesiones características de la LAC y se originan producto de la acción del sistema inmune. En su intento por limitar la propagación de la bacteria el sistema inmune acumula en el sitio de infección macrófagos, células dendríticas, células epitelioides, linfocitos y citoquinas pro-inflamatorias. Al formarse estas estructuras se desarrolla hipersensibilidad retardada dando lugar a una respuesta más elevada con necrosis y fibrosis del granuloma. En este punto la respuesta del sistema inmune del hospedero es la responsable de la formación de las lesiones características de la LAC (Paule *et al.*, 2003; Bastos *et al.*, 2012; Seyffert *et al.*, 2014).

El estudio de la respuesta inmune en ovejas infectadas con *Corynebacterium pseudotuberculosis* evidenció que la fase inicial (día 1-4 post inoculación, p.i), se caracteriza por el reclutamiento de polimorfonucleares neutrófilos hacia el sitio de inoculación y el drenaje de los nódulos linfáticos. La bacteria es internalizada por los macrófagos formándose el fagosoma y al fusionarse con el lisosoma se origina el fagolisosoma. La producción de la toxina PLD causa la hidrólisis de la esfingomielina de la membrana del fagolisosoma quedando la bacteria en el citoplasma. En la fase de amplificación (día 5-10 p.i.), se desarrollan los piogranulomas, como resultado del crecimiento bacteriano descontrolado dentro de los macrófagos, el hospedero intenta frenar y limitar la infección mediante la formación de esta estructura, que se caracteriza por la encapsulación de las células infectadas con *C. pseudotuberculosis*. En esta etapa la producción de anticuerpos es detectables (6-11 p.i) y los títulos máximos se observan entre el día 11 y 21 post infección. Los niveles disminuyen hasta los 140 días y no todos los individuos permanecen positivos durante las 20 semanas siguientes, lo que indica que la inmunidad humoral no es duradera. La producción de IFN- γ tiene lugar al inicio de la infección (5 días p.i) siendo su duración de vida corta, seguido de una segunda expresión más elevada y sostenida en el tiempo (comienza a elevarse a los 16 días p.i y disminuye a partir del 42-56 días p.i). Las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 se detectan en el sitio de inoculación, mientras que el IFN- γ se encuentra en los linfonódulos drenados. En la fase de estabilización ocurre la maduración y persistencia del piogranuloma (El-Enbaawy *et al.*, 2005; Dorella *et al.*, 2009; Bastos, 2012).

Otro estudio evaluó la inducción de la producción de quimiocinas por dos cepas de *C. pseudotuberculosis* en un modelo murino. Para estimular los esplenocitos murinos se utilizó una cepa altamente patógena (VD57) y una atenuada (T1), así como antígenos somáticos y

secretados derivados de estas cepas. Luego, se midieron las concentraciones de las quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-4 y CCL-5 en los sobrenadantes del cultivo. La cepa VD57 presentó una mayor capacidad para estimular la producción de quimiocinas en comparación con la cepa T1, especialmente en las primeras etapas de estimulación, lo que puede tener un impacto en la formación de granulomas. El antígeno lisado T1 fue capaz de estimular la mayoría de las quimiocinas estudiadas en comparación con las otras fracciones antigénicas de ambas cepas. Estos resultados indicaron que *C. pseudotuberculosis* es un inductor de la producción de quimiocinas, y las cepas bacterianas difieren en su patrón de inducción, situación que puede relacionarse con el comportamiento específico de cada cepa (Barral *et al.*, 2022).

La caracterización de los componentes celulares presentes en abscesos formados en pulmón de ovejas se evaluó mediante técnicas de inmunohistoquímica. El estudio permitió observar que son abundantes los macrófagos en las paredes del absceso rodeando el parénquima pulmonar, con expresión de moléculas MHC- II. Presentan mayor contenido de Linf T, mientras que los Linf B y granulocitos están en menor proporción. En el interior de las lesiones encapsuladas son abundantes los linfocitos y células que expresan MHC-II. En la zona externa de la lesión se encontraron células T CD4⁺ y T CD8⁺ distribuidas a través del tejido linfático. En las lesiones caseosas inmaduras se encuentran linfocitos T CD4⁺ y en las lesiones más desarrolladas la concentración de células T CD8⁺ es mayor, producto al mecanismo activado por el sistema inmune para restringir la diseminación de los macrófagos infectados (Paule *et al.*, 2003, Dorella *et al.*, 2009).

En otro estudio se caracterizaron los abscesos en nódulos linfáticos y órganos de ovejas y cabras, producto a la infección con *C. pseudotuberculosis*. Los abscesos en nódulo linfático preescapular presentaron tamaños variados, pus color verde cremoso, núcleo caseoso central rodeado de cápsula fibrosa densa. También se observó la formación de piogranuloma con la estructura de láminas concéntricas. En pulmones, hígado, glándula mamaria y nódulos linfáticos mediastínicos fueron observados abscesos de tamaños variados, con un núcleo necrótico calcificado rodeado de una densa capsula fibrosa. El examen histopatológico reveló un núcleo necrótico central rodeado por un manto periférico de células mononucleares y una cápsula fibrosa. Se detectó la expresión positiva del factor nuclear kappa B (NF- κ B/p65) e interleucina-1 β (IL-1 β) y la expresión negativa del TNF- α (Torky *et al.*, 2023).

La proliferación de linfocitos y la producción *in vitro* de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 y óxido nítrico por el bazo, se evaluaron en células estimuladas con antígenos secretados y somáticos de la cepa T1 de *C. pseudotuberculosis*. Los resultados mostraron un aumento significativo de las citoquinas del perfil Th1 después de 60 días de la inoculación, así como una importante respuesta humoral, representada por niveles elevados de IgG2a e IgG1 (Vale *et al.*, 2016).

Un análisis de proteómica cuantitativa y secuenciación de ARN se realizó con el objetivo de medir proteínas y genes en muestras de bazos de cabras infectadas experimentalmente con *C. pseudotuberculosis*. Los parámetros se evaluaron en dos intervalos de tiempo diferentes,

72 horas y 144 horas post infección. En el grupo de 72 h, 85 genes y proteínas estaban reguladas positivamente y 91 genes estaban regulados negativamente. En el grupo de 144 h, 38 genes y proteínas diferenciales estaban regulados positivamente y 51 genes estaban regulados negativamente. También se definieron 21 genes y proteínas co-regulados de forma positiva y 20 regulados de forma negativa en los dos grupos. En el grupo de 72 h se enriqueció principalmente el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico asociadas a metabolismo de lisosomas, aminoácidos y azúcares de nucleótidos y la vía de señalización de estrógenos. Por otra parte en el grupo de 144 h, se procesaron proteínas en la vía del retículo endoplásmico que presentaron ARNm-proteínas co-reguladas positivamente. Encontraron que en la etapa temprana de la infección (72 h), los pares gen-proteína regulados de forma positiva se enriquecieron en múltiples vías, que en conjunto estaban destinadas a defender contra la invasión bacteriana. Sin embargo, en las últimas etapas de la infección (144 h), cuando la enfermedad se estabiliza, algunos pares de genes y proteínas con regulación positiva desempeñaron un papel en el procesamiento de proteínas en la vía del retículo endoplásmico. Las expresiones de ARNm y proteínas en diferentes períodos de tiempo indicaron la adaptabilidad de las cabras a la bacteria (Fu *et al.*, 2022).

Los Linf T CD8⁺ producidos ante una infección aguda constituyen un elemento importante de la inmunidad protectora; sin embargo, en infecciones crónicas esta respuesta se ve afectada generándose células T exhaustas o células T disfuncionales (Wherry *et al.*, 2003). En condiciones de infecciones crónicas los linfocitos T CD8⁺ tardan varios meses o más en eliminar la infección y por tanto la función de las células T CD4⁺ es fundamental (Matloubian *et al.*, 1994). Estos hallazgos tienen implicaciones para las infecciones crónicas y persistentes en general y pueden proporcionar una posible explicación de la pérdida de actividad de los linfocitos T CD8⁺, cuando las células T CD4⁺ se vuelven limitantes. Por tales motivos, es fundamental el estudio de la respuesta inmune celular, para establecer el comportamiento de las poblaciones linfocitarias en las diferentes etapas de la infección o incluso durante la aplicación de vacunas.

II.7 Vacunas comerciales contra LAC

En el mercado existen vacunas bacterianas polivalentes diseñadas para la inmunización contra diversos patógenos ovinos, que incluyen antígenos para la profilaxis contra la LAC. Por lo general, estas vacunas se formulan en base a cultivos totales de *C. pseudotuberculosis ovis* inactivados, fundamentalmente con PLD, debido a que es un factor de virulencia con elevada capacidad inmunogénica (Bastos *et al.*, 2012). Estas vacunas comerciales se han utilizado desde hace varios años, pero no están a la venta en México y otros países dedicados a la ganadería ovina y caprina. Los niveles de protección inducidos por estas vacunas son variados, siendo un denominador común el efecto protector parcial, ya que disminuyen las

manifestaciones clínicas de la enfermedad y se reduce los granulomas en los animales vacunados (Paton *et al.*, 1995; Stanford *et al.*, 1998).

La vacuna Glanvac 3 (Zoetis, London), está compuesta por antígenos de *Clostridium perfringens* Tipo D, *Clostridium tetani* y *C. pseudotuberculosis*. Esta vacuna se ha utilizado en el Reino Unido para la inmunización de ovinos dando como resultado en animales infectados la formación de lesiones solo en un 20.8% (Fontaine *et al.*, 2006).

La vacuna Glanvac 6 (Zoetis, West Ryde, Australia), también está compuesta por toxinas, es multicomponente y está dirigida a la inmunización contra *C. pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novy* tipo B, *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei*. La aplicación de esta vacuna disminuye los signos y síntomas clínicos de la LAC, así como la producción de abscesos en pulmones. El programa de vacunación establece que es necesaria la aplicación de dos dosis, espaciadas por un intervalo de un mes y un refuerzo anual (Windsor *et al.*, 2014; Windsor *et al.*, 2016). Glanvac 6 se utiliza en los esquemas de vacunación contra LAC en países productores como Australia, Canadá y Nueva Zelanda (Windsor, 2011, Windsor *et al.*, 2016). Esta vacuna se utiliza en Australia para el control de la LAC tanto en ovinos como en caprinos, y se ha reportado en estudios de campo valores de protección que van desde 25% hasta 90% del total del rebaño. La aplicación constante de este inmunógeno ha logrado disminuir la incidencia de la enfermedad en diferentes regiones de Australia. En 1995 se evaluó el efecto de la aplicación de esta vacuna, siendo los valores de prevalencia para esa fecha elevados en diferentes regiones del país. En Nueva Gales del Sur la prevalencia era de un 97%, de 91% en Victoria y de 88% en Australia Occidental. Posteriormente, en el 2003 se realizó un monitoreo de las mismas regiones y se constató una disminución en la prevalencia (Nueva Gales del Sur (29%), Victoria (26%), Australia Occidental (20%); y para el 2009 los valores disminuyeron en general de un 26% a un 5.9%. También se identificó que solo el 43% de los ganaderos aplicaban la vacuna y de estos 12% respetaban las instrucciones del fabricante (Paton, 2003; Windsor, 2014).

Las vacunas Glanvac constituyen una alternativa para inducir profilaxis en los rebaños; sin embargo, en ocasiones se reportan reacciones no deseadas como la formación de abscesos en el sitio de administración de la vacuna, incluso choques anafilácticos en caprinos (Williamson, 2001).

En el caso de Canadá en 1998 se evaluó la eficacia de Glanvac 6, en un periodo comprendido de 6 a 12 meses de aplicación, y los resultados se compararon con la vacuna Case-Bac (Colorado Serum, EUA), y otra formulación experimental a base de muramil dipéptido. Glanvac 6 y el formulado experimental presentaron los niveles de anticuerpos más elevados, sin embargo, Glanvac 6 ocasionó reacciones adversas en el sitio de inoculación (Stanford *et al.*, 1998).

La vacuna Caseous D-T (Colorado Serum, EUA) está formulada en base a toxinas de *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, y de *C. pseudotuberculosis* contiene toxina PLD y cultivos totales de la bacteria inactivados. Esta vacuna se ha utilizado en

Estados Unidos y existen reportes que documentan una menor producción de abscesos internos y externos. Sin embargo, esta vacuna también puede ocasionar efectos adversos como: leve cojera y manifestaciones de molestias en ovinos jóvenes y letargo en general en gran parte de la población vacunada (ValleyVet, 2020). También Case-Bac (Colorado Serum, EUA), presenta como antígeno principal la toxina PLD y es empleada fundamentalmente en ovejas, con una aplicación de 2mL vía subcutánea y una segunda dosis a las 4 semanas. Esta vacuna también puede ocasionar abscesos no deseados en el sitio de inoculación, letargo, rigidez y fiebre, siendo estas afectaciones de mayor envergadura en caprinos, incluyendo formación de edema ventral, ataxia y convulsiones, motivo que impide su aprobación para la profilaxis en caprinos. En un estudio realizado en ovinos, la aplicación de esta vacuna impidió la formación de abscesos externos en 8 de 18 animales y solo 2 del total de vacunados desarrollaron abscesos (Williamson, 2001).

La vacuna Biodectin™ (Zoetis, España), está compuesta por seis componentes antigénicos de: *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Tipo B, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* Tipo D, *C. pseudotuberculosis* y *Clostridium chauvoei*, con hidróxido de aluminio como adyuvante, Tiomersal como preservante y Moxidectina (compuesto con actividad antiparasitaria). La aplicación de esta vacuna se realiza vía subcutánea de 2mL (50kg de peso) o 3mL (51 a 75kg). Se debe vacunar anualmente y para el caso de ovejas en gestación se debe revacunar de 4 a 6 semanas antes del parto (Zoetis, 2020).

Otra variante de vacuna comercial contra la LAC es LinfoVac (Laboratorios Vencofarma do Brasil), producida en Brasil por la Empresa Baiana de Desarrollo Agrícola (www.ebda.ba.gov.br) en conjunto con el Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Federal de Bahía. La formulación de esta vacuna se basa en el uso de la cepa viva atenuada de *C. pseudotuberculosis* 1002 y su evaluación experimental en ratones mostró un 80% de protección ante el desafío con una cepa virulenta (Bastos *et al.*, 2012).

Las vacunas comerciales favorecen la producción de anticuerpos anti-exotoxina PLD, los cuales protegen contra el daño tisular y la diseminación del microorganismo. Sin embargo, confieren una protección parcial ya que son menos eficientes en la activación de la respuesta inmune celular, principalmente de tipo Linfocitos T citotóxicos, población celular necesaria para la eliminación de las bacterias intracelulares. Estos antecedentes son el motivo por el cual diferentes grupos de investigadores continúan trabajando en el desarrollo de vacunas que permitan mejorar la protección.

II.8 Vacunas experimentales de subunidades proteicas PLD y CP40.

El desarrollo de vacunas de subunidades a partir de proteínas semi-puras o purificadas, así como la obtención de los componentes de las subunidades producidas mediante tecnología de ADN recombinante también se ha evaluado para la Linfadenitis caseosa (de Pinho *et al.*, 2021). Estas vacunas confieren la ventaja de combinar múltiples antígenos definidos

administrados en la presencia de adyuvantes, permitiendo inducir inmunidad contra el patógeno. Además, permiten eliminar el riesgo de co-purificación, de contaminantes no deseados o presencia de toxinas. Los antígenos pueden ser lipídicos, carbohidráticos, péptidos sintéticos o proteínas recombinantes. En las formulaciones se pueden utilizar los antígenos completos o las regiones de mayor potencial inmunogénico, evitándose el uso del patógeno y por tanto siendo seguras e inocuas. Por otra parte, para la producción a grandes escalas no se requiere de utilizar la bacteria patógena, siendo una ventaja para el caso de *C. pseudotuberculosis ovis* la cual es zoonótica. Si bien ofrecen numerosas ventajas, hay que tener en cuenta que este tipo de vacunas no son inmunogénicas y se debe potenciar su acción mediante el uso de moléculas adyuvantes (Jorge y Dellagostin, 2017).

Uno de los antígenos más utilizados en las formulaciones vacunales contra la LAC es la exotoxina PLD obtenida vía recombinante, ya que al ser el factor de virulencia principal de la bacteria es indispensable dotar al hospedero de protección ante la acción de esta molécula. El efecto protector de la proteína PLD (50µg) obtenida por vía recombinante en *E. coli* aplicada en conjunto con cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* (1.25×10^{10} células/mL) inactivados con formalina se evaluó en ovejas desafiadas con una cepa de *C. pseudotuberculosis* virulenta (10^4 UFC/mL). La vacuna se aplicó vía subcutánea y el esquema de inmunización contó con un tiempo de 4 semanas entre la primera y la segunda dosis, mientras que el desafío se realizó 2 semanas tras culminada la vacunación. Como controles se utilizó la vacuna comercial Glanvac 3 (Commonwealth Serum Laboratories (CSL) Ltd., Victoria, Australia) y el cultivo total de *C. pseudotuberculosis* inactivado. La producción de IgG totales fue superior en los grupos que incluyeron PLDr, en comparación con los grupos controles. Los niveles máximos de anticuerpos anti-PLD se obtuvieron antes de la segunda dosis con cultivos totales inactivados, siendo la PLDr de mayor contribución a la respuesta inmune humoral. No se formaron abscesos en los animales de los grupos vacunados con PLDr y PLDr + células totales inactivadas, solo en este último, lesiones en el sitio de inoculación que fueron resueltas. Estos resultados manifiestan el potencial de la proteína PLD recombinante para el desarrollo de una respuesta inmune humoral más elevada, en comparación con la vacuna Glanvac 3 (Fontaine *et al.*, 2006).

Cultivos totales de *C. pseudotuberculosis ovis* y *equi* (20mg), inactivados con formaldehído, se evaluaron en una formulación con PLDr (50µg) para la inmunización de ovinos. Las vacunas se aplicaron en 2 dosis con un intervalo de 21 días, y posteriormente se realizó el desafío con 2×10^6 UFC/mL de un aislado autóctono perteneciente al biovar *ovis*. Los animales presentaron niveles elevados de anticuerpos anti-PLD luego de la segunda dosis, con valores por encima del valor de corte durante 20 semanas. No se formaron abscesos en nódulos linfáticos interno o externos, mientras que el 80% de los animales del grupo desafiado no vacunado, desarrollaron la enfermedad. Cabe destacar que en este trabajo se obtuvieron resultados similares en los grupos inmunizados tanto con el biovar *ovis* como con el *equi* en su combinación con PLD obtenida por vía recombinante (Moussa *et al.*, 2016).

Las formulaciones vacunales también se han evaluado empleando modelos murinos, ya que este permite el desarrollo de la enfermedad con la reproducción de lesiones internas y externas, la evaluación de la respuesta inmune y constituye un modelo experimental económico, fácil de utilizar y con resultados aplicables al organismo diana (de Oliveira *et al.*, 2020).

La combinación de las proteínas recombinantes esterasa (rCP09720), proteína L14 de unión a la subunidad 50S ARNr (rCP01850) y la PLD se utilizaron en formulaciones vacunales contra la LAC, evaluadas en un modelo murino de ratones BALB/c. Los resultados evidenciaron tasas de supervivencia de 30% (rPLD), 40% (rPLD + rCP09720) y 50% (rPLD + rCP01850) luego de desafiados los animales con una cepa de *C. pseudotuberculosis* virulenta. La formulación de rCP01850 con rPLD fue la más eficiente, para una protección del 50% de los animales de ese grupo, con niveles significativos de anticuerpos IgG2. La respuesta inmune celular también se activó con la obtención de valores significativos de INF- γ y TNF- α ; sin embargo, la producción de IL-4 e IL-12 no fue detectada (Silva *et al.*, 2018). La cepa *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus-Calmette-Gueri) ha sido utilizada como hospedero para la obtención de PLD recombinante. Aunque el sistema no es eficiente para la producción de la proteína en concentraciones elevadas, su empleo como vacuna viva atenuada confirió protección en un modelo murino infectado experimentalmente con *C. pseudotuberculosis ovis*. En el estudio se utilizaron 10^6 UFC/mL de *M. bovis* transformado con el plásmido pUS2000/*pld* para la expresión de PLDr, así como la cepa *M. bovis* pUS2000/*pld* en combinación con la PLDr (50 μ g) purificada y la cepa *M. bovis* sin transformar. Las formulaciones indujeron elevados niveles de inmunoglobulinas aunque sin diferencias significativas entre los grupos vacunados. *M. bovis* tiene potencial para inducir la respuesta inmune de tipo humoral y celular, por lo que constituye un agente adyuvante. Luego del desafío con *C. pseudotuberculosis ovis* cepa MIC-6 (2×10^4 UFC/mL) en el grupo inmunizado con *M. bovis* pUS2000/*pld* aumentaron significativamente los niveles de anticuerpos IgG en comparación con el resto de los grupos. Se midió *in vitro* los niveles de IFN- γ e IL-10, a partir de la estimulación con 8 μ g/mL de PLDr añadido en el cultivo de células del bazo de los animales vacunados. La concentración de IFN- γ fue superior en las células de los animales del grupo vacunado con pUS2000/*pld* + segunda dosis con PLDr (498pg/mL), seguido del grupo vacunado con *M. bovis* pUS2000/*pld* (420pg/mL) y por último *M. bovis* no transformada (365pg/mL). La producción de IL-10 fue superior en las células del grupo *M. bovis* pUS2000/PLD 1317pg/mL en comparación con las del grupo *M. bovis* pUS2000/PLD+ PLDr (590pg/mL) y el grupo Control (252pg/mL). Se reportaron niveles de protección de 88% en los animales vacunados con *M. bovis* pUS2000/*pld* + 50 μ g de PLDr, de 77% en *M. bovis* pUS2000/PLD y 66% para el grupo *M. bovis* no modificado. La respuesta inmune protectora estuvo favorecida por el componente celular de *M. bovis* BCG y la expresión de PLD como antígeno principal contra la LAC. Además, en los

animales que recibieron una segunda dosis de refuerzo con PLDr se favoreció el aumento de los Linf B y T específicos para este antígeno (Leal *et al.*, 2018).

Otro antígeno con potencialidades inmunoprotectoras contra la LAC es la proteína CP40, la cual se ha utilizado también obtenida por vía recombinante. La CP40 se detectó en el sobrenadante del cultivo de *C. pseudotuberculosis*, y es purificada junto con la toxina PLD que se utiliza en las formulaciones de vacunas a base de cultivos totales inactivados (Walker *et al.*, 1994). La aplicación de ensayos de inmunoblot para la caracterización de sueros de animales inmunizados con la vacuna comercial Glanvac permitió la detección de anticuerpos dirigidos contra este antígeno, por lo que se propone que CP40 se encuentra formando parte de la mezcla de proteínas que se utilizan en la preparación de la vacuna. En ovejas se evaluó el efecto inmunoprotector de este antígeno (100µg) obtenido vía recombinante quedando el 82% de los animales protegidos ante la infección experimental con una cepa virulenta, así como también hubo disminución en el desarrollo de abscesos a nivel de pulmón (afectaciones solo en un 2% de los animales). No se detectaron cambios significativos en la respuesta inmune humoral y la disminución en el desarrollo de lesiones pulmonares, de ahí que la respuesta celular debe estar actuando en la protección (Walker *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995).

En otro estudio se realizó una comparación entre cuatro combinaciones de vacunas con CP40 recombinante y una cepa viva atenuada de *C. pseudotuberculosis ovis* (CP09). Las formulaciones se evaluaron en ratones BALB/c, los cuales fueron desafiados vía intraperitoneal con la cepa virulenta MIC-6 (10^4 UFC/mL). La vacuna con 10^6 UFC/mL de *C. pseudotuberculosis* CP09 no aumentó la respuesta inmune humoral, mientras que las vacunas con CP40r (CP40r + cepa atenuada CP09; CP40r 1ra dosis seguido cepa CP09 2da dosis), 30 días post inmunización presentaron un aumento significativo en el título de anticuerpos IgG1. En estos grupos tras el desafío aumentaron los niveles de IgG2, siendo el máximo alcanzado por los animales inmunizados con CP40r. El isotipo IgG2 se encuentra relacionado con una respuesta celular de Th1, células involucradas principalmente en la inmunidad contra patógenos intracelulares, activación de macrófagos y células T citotóxicas, producción de opsonización y activación del complemento. La protección conferida por CP40r fue de un 90% de los animales ante el desafío con la cepa virulenta, mientras que el grupo vacunado con la cepa atenuada CP09 + CP40r confirió un 70%, la vacunación con CP40r seguido de la inmunización con CP09 protegió solo al 60% y la cepa CP09 por si sola al 50%. Estos resultados indican que las formulaciones con la proteína CP40 recombinante fueron más eficientes en la protección asociada a una respuesta celular Th1, en ausencia de un perfil Th2 después del desafío (Silva *et al.*, 2014).

Otra vacuna de subunidades en base a CP40 recombinante se evaluó en ratones BALB/c potenciando la respuesta con saponina o adyuvante completo de Freud (ACF). Una vez completado el esquema de vacunación a los 40 días se realizó el desafío con 10^4 UFC/mL de la cepa virulenta C57. Los animales del grupo CP40r / saponina mostraron valores elevados

en los niveles completos de anticuerpos IgG anti-CP40r y de las subclases IgG2a, IgG2b e IgG3, con diferencia estadísticamente significativas con respecto al grupo control al día 60 después de la inmunización. Las dos vacunas protegieron al 100% de los animales desafiados, a diferencia del grupo control negativo. Los resultados indican que la proteína CP40 induce una respuesta de tipo LinF Th1, así como también respuesta inmune humoral (Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Vacunas experimentales contra Linfadentis Caseosa

Vacuna	Adyuvante	Cepa Desafío	Concentración	Vía Inoculación	Hospedero	Referencia
Toxina PLD	Hidróxido de aluminio	cepa virulenta	10^8 UFC/mL	subcutáneo	ovejas	Eggleton <i>et al.</i> , 1991
Cepa atenuada Toxminus	-	MIC-6	10^6 UFC/mL		ovejas	Hodgson <i>et al.</i> , 1992
Extracto CP40	-	cepa virulenta	2×10^6 UFC/mL	subcutáneo	ovejas	Walker <i>et al.</i> , 1994
Cepa Toxminus	-	cepa virulenta	10^6 UFC/mL	subcutáneo	ovejas	Hodgson <i>et al.</i> , 1994
Cepa mutante AroQ/ <i>pld</i>	-	C231	10^6 UFC/mL	subcutáneo	ovejas	Simmons <i>et al.</i> , 1997
Cultivos totales inactivados/PLD modificada	Hidróxido de aluminio	cepa Virulenta	10^8 UFC/mL	subcutáneo	ovejas	Hodgson <i>et al.</i> , 1999
Proteínas Totales	-	cepa Virulenta	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Medrano <i>et al.</i> , 2003
Cultivos totales/PLDr	Hidróxido de aluminio	cepa Virulenta	10^4 UFC/mL	subcutáneo	ovejas	Fontaine <i>et al.</i> , 2006
Pared celular y toxina PLD	Muramil dipéptido	cepa alpaca	10^6 UFC/mL	Intradérmica	Alpacas	Braga <i>et al.</i> , 2007
Extractos antigénicos	AIF/oligodesoxi	VD57	10^5 UFC/mL	Intradérmica	cabras	Moura-Costa <i>et al.</i> , 2008
Cepa atenuada CZ171053	-	MIC-6	10^6 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Ribeiro <i>et al.</i> , 2014
CP40r y cepa CP09 atenuada	Saponina	MIC-6	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Silva <i>et al.</i> , 2014
CP40 recombinante	Saponina	C57	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Droppa-Almeida <i>et al.</i> , 2016
PLDr/ célula completa	-	cepa Virulenta	2×10^6 UFC/mL	Intradérmica	ovejas	Moussa <i>et al.</i> , 2016
plásmido pAE-cp09720/esterasa recombinante	Hidróxido de aluminio	MIC-6	2×10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Brum <i>et al.</i> , 2017

esterasa, proteína L14 y PLDr	-	MIC-6	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Silva <i>et al.</i> , 2018
PLD /Cultivos totales	-	cepa virulenta	4×10^6 UFC/mL	Intradérmica	ovejas	Syame <i>et al.</i> , 2018
PLDr	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	MIC-6	2×10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Silva <i>et al.</i> , 2018
CP40r	Saponina/ ACFreund	VD57	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones C57Black/6	Droppa-Almeida <i>et al.</i> , 2019
Proteínas rNanH, rPknG	Saponina	MIC-6	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Silva <i>et al.</i> , 2020
Vacuna de ADN pCP01850/ pCP01850r	Hidróxido de aluminio	MIC-6	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Rezende <i>et al.</i> , 2020
<i>E coli</i> plásmido pAE-PLD/PLDr	Saponina	MIC-6	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	de Pinho <i>et al.</i> , 2021b
Proteínas rCP00660, rCP09720, rCP01850	Saponina	MIC-6	10^4 UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c	Bezerra <i>et al.</i> , 2021

También se han caracterizado nuevas moléculas que participan en la inmunopatogénesis y que podrían ser candidatos para el desarrollo de vacunas (Galvao *et al.*, 2017; Raynal *et al.*, 2018; Sobrinho-Santos *et al.*, 2018). Sin embargo, las formulaciones que utilizan como antígenos a la PLD o CP40, obtenidas por vía recombinante, han mostrado buenos resultados en cuanto a protección y eficacia de las vacunas contra la LAC.

II.9 Adyuvantes: saponinas

Las vacunas de subunidades recombinantes son una alternativa segura; sin embargo, son poco inmunogénicas, deficientes en activar múltiples vías de señalización inmune innata y persistir, lo que requiere el uso de adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad y programar una inmunidad duradera. Los adyuvantes son sustancias capaces de mejorar y/o potenciar la respuesta del sistema inmune ante los antígenos vacunales. La selección del adyuvante y la formulación debe basarse en varios parámetros, incluida la naturaleza física y química del antígeno, el tipo de respuesta inmune deseada, la edad de la población objetivo y la vía de administración de la vacuna.

Los adyuvantes pueden realizar su acción mediante dos mecanismos, pueden promover la generación de presentación de antígenos (señal 1) o pueden actuar como señales coestimuladoras activando células APC (señal 2) (Zhao *et al.*, 2023) (Figura 5).

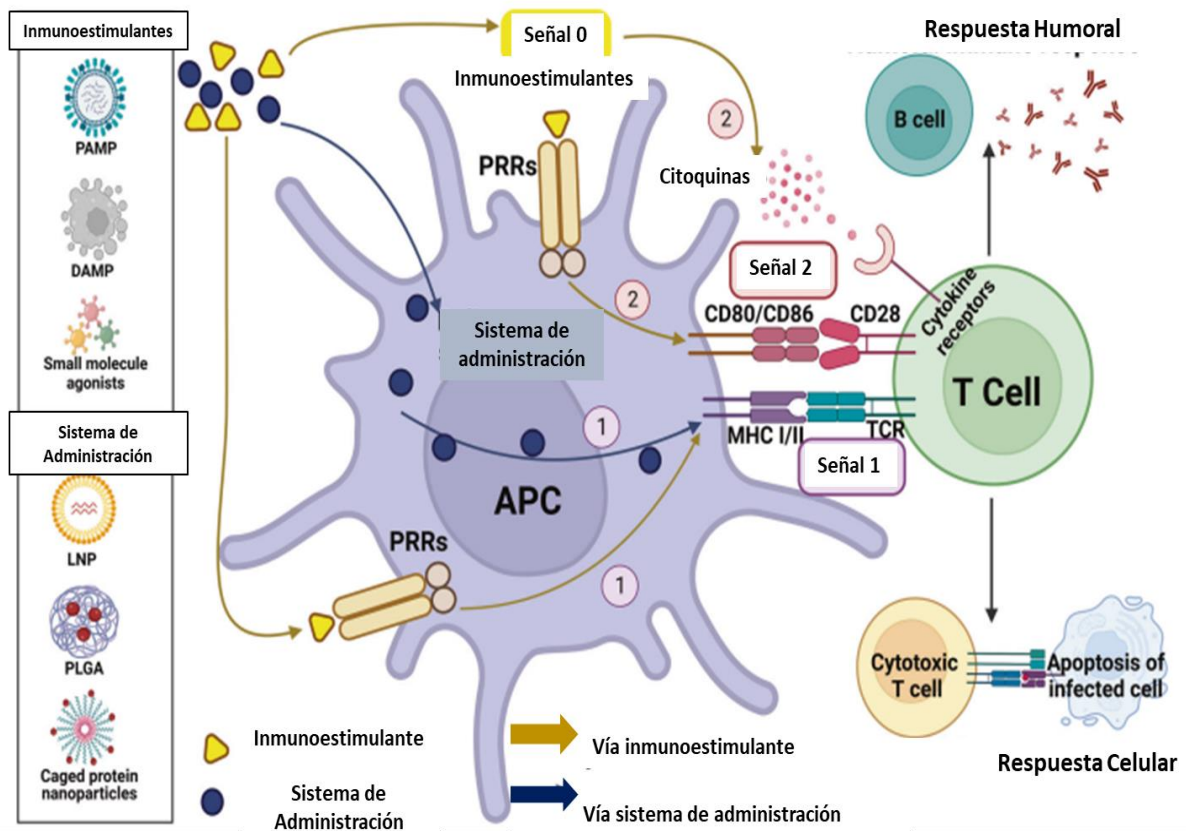


Figura 5. Mecanismos de acción de los adyuvantes. Los adyuvantes se clasifican en inmunoestimulantes y de sistemas de administración. Los inmunoestimulantes como PAMP, DAMP y agonistas de moléculas pequeñas sintetizadas químicamente, proporcionan señales de peligro (señal 0) para activar los PRR en las células APC, mejorando así la presentación de antígenos en moléculas de MHC (señal 1). Además, la activación de los PRR conduce a una regulación positiva de expresión de citoquinas y moléculas coestimuladoras, lo que da como resultado una señalización coestimuladora mejorada (señal 2). La señal 1 de presentación del antígeno, implica el complejo péptido-MHC presentados en la superficie de las APC después de que se han tomado los antígenos. En cambio la señal 2, coestimuladora, incluye la acción de las moléculas CD40, CD80, CD86, expresadas en la superficie de las APC y citoquinas inflamatorias secretadas (IL-6, IL-10, IL-12, y TNF- α). La producción de estas dos señales puede fuertemente inducir la activación de células T vírgenes, lo que lleva a una mayor respuesta inmune adaptativa. Modificado de Zhao *et al.*, 2023.

Según sus mecanismos de acción, los adyuvantes se pueden clasificar en inmunoestimulantes o de sistemas de administración. Los inmunoestimulantes son moléculas de señal de peligro que conducen a la maduración y activación de las APC, al dirigirse a receptores específicos en las células de las APC. Estos actúan como PAMP, DAMP o pueden interactuar con los PRR en las APC para desencadenar un efecto de respuesta inmune innata, con la activación

y maduración de APC. Las APC maduras terminan su actividad antigénica fagocítica y mejoran su capacidad para presentar antígenos y expresar niveles altos de señales coestimuladoras y citocinas (Zhao *et al.*, 2023).

Algunos ejemplos de los adyuvantes más utilizados son las Sales de Aluminio, el Adyuvante completo de Freund, emulsiones en aceite y agua (MF59), ADN bacteriano (oligonucleótidos CpG), Lipopolisacáridos (LPS), Monofosforil lípido A (MLP), Citoquinas (IL-2, IL-12, GM-CSF), Liposomas, Virosomas, ISCOMS, Saponinas como Quil-A o QS21 entre otros (Coffman *et al.*, 2010; Lee y Suresh, 2022).

Sales de aluminio: Estos adyuvantes consisten en precipitados de fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio en los que se adsorben antígenos. Se utilizan principalmente para mejorar la producción de anticuerpos y no utiliza TLR para su efecto. En humanos, las respuestas tienden a ser una mezcla de células Th1 y Th2 (Didierlaurent *et al.*, 2009); sin embargo, en ratones induce una respuesta de células Th2 profundamente polarizada, con isotipos de anticuerpos dependientes de células Th2, frente a casi todos los antígenos proteicos. Los estudios *in vitro* que emplean macrófagos y DC han demostrado que después del cebado con lipopolisacárido (LPS), este adyuvante puede activar el inflamasoma NLRP3 para producir IL-1 β maduro (Li *et al.*, 2007). Este proceso parece implicar la fagocitosis de los cristales del aluminio y la liberación lisosomal de cathepsina B en el citoplasma, donde la enzima se localiza en el sitio de actividad inflamatoria asociada a caspasa-1 (Hornung *et al.*, 2018). Además de la activación del inflamasoma por el propio adyuvante, este también puede desencadenar la muerte celular necrótica y la liberación de la señal de peligro endógena.

Adyuvante completo de Freund (CFA): Es una mezcla de aceite de parafina y tensioactivo con *Mycobacterium tuberculosis* o *M. butyricum* inactivado. La inmunización con antígenos proteicos en CFA da como resultado fuertes respuestas de las células Th1 y Th17 que dependen del componente microbacteriano y requieren la señalización MyD88 del hospedero. Las micobacterias contienen potentes ligandos TLR2, 4 y 9; sin embargo, la señalización a través de IL-1R en lugar de TLR explica en gran medida la necesidad de MyD88 en la mejora de las respuestas de las células T. El inflamasoma también es necesario para el procesamiento de la IL-1 que desencadena esta vía mediada por IL-1R (Shenderov *et al.*, 2010). Los efectos de CFA sobre la respuesta humoral son independientes del inflamasoma y el requisito de vías de señalización dependientes de MyD88 o TRIF varía en diferentes modelos experimentales (Gavin *et al.*, 2006). Un componente micobacteriano con potente actividad adyuvante es el dimicolato de trehalosa (factor cordón) (Schoenen *et al.*, 2010) así como el peptidoglicano, componentes que estimulan los receptores NOD (Fritz *et al.*, 2007).

Emulsiones en aceite-agua: MF59 (Novartis) y AS03 (GlaxoSmithKline) son emulsiones de aceite en agua basadas en escualeno, un aceite que se metaboliza más fácilmente que el aceite de parafina utilizado en los adyuvantes de Freund. Estas emulsiones estimulan respuestas de

anticuerpos más fuertes, permiten menos dosis y ahorran dosis de antígeno, generando respuestas de memoria marcadas, con un fenotipo de células Th1-Th2 mixto. MF59 induce una estimulación local sustancial, reclutamiento de DC, granulocitos y diferenciación de monocitos en DC (Seubert *et al.*, 2008), así como una mayor absorción de antígeno por parte de las DC (Dupuis *et al.*, 1998).

Ligandos TLR3 y ARN viral bicatenario (ARNds): El descubrimiento del ARN viral bicatenario (ARNds) como potente activador de la inmunidad innata fue un hallazgo fundamental para comprender la inmunidad del hospedero ante infecciones virales (Alexopoulou *et al.*, 2001). Se han utilizado análogos sintéticos de ARNds (Poly IC) como adyuvantes (Longhi *et al.*, 2009; Stahl-Hennig *et al.*, 2009) y pueden actuar a través de dos tipos distintos de PRR. El ARNds viral o sintético activa TLR3 en endosomas (Alexopoulou *et al.*, 2001) o a través de helicasas de ácido ribonucleico (ARN) citosólico (RLR), como el gen 1 inducible por ácido retinoico (RIG-I) y el gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5) (Kato *et al.*, 2006).

CpG-ODN: El TLR9 es el único PRR endosómico específico para el ADN y media una potente respuesta innata ante el ADN bacteriano y viral (Blasius y Beutler, 2010). Se reconocen preferentemente los motivos de secuencia que contienen el dinucleótido CpG; sin embargo, secuencias de bases específicas sólo explican parcialmente la unión de TLR9. Los oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos de 18 a 25 bases con motivos CpG optimizados (CpG-ODN) se han estudiado ampliamente como adyuvantes, ya sea solubles o formulados en nanopartículas (Marshall *et al.*, 2004) o partículas similares a virus (Jennings y Bachmann, 2009). CpG-ODN mejora las respuestas de anticuerpos y polariza fuertemente las respuestas de las células Th hacia Th1 y las aleja de las respuestas de las células Th2 (Kobayashi *et al.*, 1999; Tighe *et al.*, 2000).

ISCOMs: Los complejos inmunoestimuladores (ISCOM) son nanopartículas en forma de entramado compuestas de saponinas purificadas de la corteza de un árbol sudamericano, Quillaja saponaria, formuladas con colesterol, fosfolípidos y antígeno. No es necesario incorporar antígenos de la vacuna a las partículas, y la mayoría de las aplicaciones actuales utilizan una mezcla de antígenos solubles y la partícula libre de antígeno, como ISCOMATRIX. Los ISCOM no actúan a través de ningún PRR identificado; sin embargo, mejoran la captación de antígenos y prolongan la retención por parte de las DC en los nódulos linfáticos de drenaje, inducen la activación de las DC y conducen a fuertes respuestas de anticuerpos y células T (Maraskovsky *et al.*, 2009). Aunque los ISCOM son potentes potenciadores de las células Th, no imponen un sesgo a la respuesta de las células Th1 o Th2. A diferencia de la mayoría de los otros adyuvantes, los ISCOM permiten una presentación en el contexto del MHC de clase I e inducen respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ ante una variedad de antígenos proteicos solubles (Davis *et al.*, 2004). Los ISCOM desestabilizan la membrana endosómica, permitiendo un mayor acceso citoplásmico para los antígenos

coadministrados en comparación con otras formas de administración de antígenos (Schnurr *et al.*, 2009).

Saponinas: Las saponinas son una gran familia de glicoconjugados que se subdividen en dos clases principales, las saponinas triterpenoides y esteroides (Abe *et al.*, 1993), ambas derivadas de los 30 átomos de carbono que contienen el precursor oxidoscualeno (Haralampidis *et al.*, 2002). La diferencia entre las dos clases radica en el hecho de que a las saponinas esteroides se les eliminan tres grupos metilo (son moléculas con 27 átomos de carbono), mientras que en las saponinas triterpenoides se conservan los 30 átomos. Las saponinas presentan una o más cadenas de azúcares lineales o ramificadas que contienen glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, ramnosa o metilpentosa, fusionada a la aglicona mediante un enlace éter o éster glicosídico y pueden presentar azúcares acilados. Según el número de cadenas de azúcar unidas a la aglicona, las saponinas pueden ser saponinas monodesmosídicas (con una sola cadena de azúcar) o saponinas bidesmosídicas (con dos cadenas de azúcar). El potencial adyuvante de la saponina depende de su estructura compuesta por cadenas laterales de azúcar hidrófilico y el esqueleto de aglicona hidrófobo (Oda *et al.*, 2000). También se pensaba que la actividad adyuvante de las saponinas estaba relacionada con cadenas de azúcar ramificadas o grupos aldehído o con un residuo acilo que lleva la aglicona.

El grupo carbohidrático de la saponina influye en su capacidad de adyuvante, se reconoció que la cadena lateral del azúcar en las saponinas puede ser esencial para su adyuvancia (Wang, 2021). Las soya-saponinas que portan cadenas de azúcar mostraron adyuvancia estimulando respuestas de anticuerpos anti-OVA total-IgG e IgG1, mientras que sus correspondientes agliconas, soya-sapogenoles A y B, no lo hicieron. Entre las soya-saponinas bidesmosídicas, la soya-saponina A1 con una larga cadena lateral de azúcar indujo respuestas de anticuerpos IgG total e IgG1 más fuertes que la soya-saponina A2. Para las soya-saponinas monodesmosídicas, la clasificación en términos de respuesta de anticuerpos fue soya-saponina I > soya-saponina II > soya-saponina III. Así, Oda y colaboradores concluyeron que la actividad adyuvante tendía a aumentar con la cadena lateral del azúcar (Oda *et al.*, 2000).

Se ha planteado que las saponinas no deberían usarse como adyuvantes debido a sus propiedades hemolíticas intrínsecas. Sin embargo, hay saponinas que muestran un efecto hemolítico bajo o nulo. Se considera que la actividad hemolítica de las saponinas está influenciada por la afinidad de la aglicona por el colesterol en las membranas celulares. El grado de actividad o afinidad depende del tipo de aglicona en sí (Takechi *et al.*, 1992), o de la presencia de cadenas laterales que llevan aglicona; cadenas de azúcares, residuos acilo o el sistema de estructura epoxi (Sun *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006).

Takechi y Tanaka analizaron la actividad hemolítica de 27 saponinas de 75 esteroides sintéticos y glucósidos triterpénicos y encontraron que la actividad hemolítica de los

esteroides era mayor que la de los triterpenoides y las tasas hemolíticas de los esteroides eran más rápidas que las de los triterpenoides (Takechi y Tanaka, 1995).

En un estudio de la relación entre la actividad hemolítica, adyuvante y la estructura de las saponinas de tipo protopanaxadio y protopanaxatriol de las raíces de *P. notoginseng*, se encontró que el número, la longitud y la posición de las cadenas laterales de azúcar, y el tipo y enlace del grupo glucosilo en la estructura de estas saponinas no sólo podría afectar los potenciales adyuvantes, sino que también tendría efectos significativos sobre la naturaleza de las respuestas inmunes (Sun *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Recientemente se ha informado que el número de residuos de azúcar en las cadenas glicídicas unidas al C-3 de la aglicona podría afectar las actividades adyuvantes de las saponinas de tipo platicodigenina, y la actividad adyuvante disminuyó con el mayor número de monosacáridos de los restos glicídicos en la base C-3 de la aglicona (Xie *et al.*, 2008).

Existen diferentes tipos de saponinas que son utilizadas como adyuvantes en las formulaciones vacunales.

Ginseng saponinas: Las saponinas de ginseng (ginsenosídeos) son las sustancias activas de la raíz de *Panax ginseng*. El extracto de ginseng aumentó significativamente la fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares en sangre y la destrucción intracelular (Scaglione *et al.*, 1990), la proliferación de linfocitos (Wu *et al.*, 1991) y la producción de IFN y TNF (Smolina *et al.*, 2001). El extracto de ginseng también mejora la respuesta de anticuerpos específicos contra el toxoide diftérico en ratones (Yang *et al.*, 1983) y aumenta la respuesta de anticuerpos IgG e IgM en ratones inmunizados con glóbulos rojos de oveja.

Saponinas de *Panax notoginseng*: 50 saponinas diferentes aisladas de *P. notoginseng* pertenecen a las saponinas de tipo damarane, son los principales principios bioactivos de este fármaco y representan el 12% de la raíz total (Smolina *et al.*, 2001). Estas saponinas incluyen ginsenosídeos, notoginsenosídeos y gypenosídeos y están compuestas de un protopanaxadiol y de glucósidos de protopanaxatriol (Lau *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Se demostró que las saponinas de *P. notoginseng* mejoran significativamente la respuesta inmune celular y de anticuerpos específicos contra ovalalbumina (OVA) en ratones. También se examinó el efecto adyuvante de once notoginsenosídeos (A, C, D, G–N), dos ginsenosídeos (Rb1, Rg1) y cinco quinquenosídeos (I–V) de *P. notoginseng* y *P. ginseng*, y encontraron que los notoginsenosídeos D, G, H y K pueden aumentar el nivel sérico de IgG en ratones inmunizados con OVA, y los notoginsenosídeos A, C, I, L y N y los quinquenosídeos III–V tendieron a mostrar esta actividad (Yoshikawa *et al.*, 2001). El mecanismo responsable de la actividad adyuvante de la saponina de *P. notoginseng* se evaluó en ratones contra OVA y se demostró que el ginsenosídeo Rd induce respuesta inmune celular Th1 y de anticuerpos específicos de antígeno (Xie *et al.*, 2008).

Quillaja saponaria Molina (Quil-A y QS-21): Los extractos de la corteza del árbol Quillaja saponaria Molina contiene una mezcla heterogénea de saponinas estrechamente relacionadas con glicosilación estructuralmente diferente o patrones de acilación que condicionan sus

actividades biológicas. De los numerosos componentes que se pueden purificar, de *Q. saponaria* Molina, Quil-A y QS-21 son los más caracterizados, tanto estructural como funcionalmente, y están asociados con una potente actividad adyuvante (Wang, 2021).

El extracto de saponaria como adyuvante se describió por primera vez en la década de 1930 y posteriormente se utilizó para mejorar una vacuna contra la fiebre aftosa. En 1978, Dalsgaard obtuvo por primera vez una mezcla enriquecida de saponinas (Quil A) de este extracto, y descubrió que Quil A estimulaba la inmunidad humoral y celular, además de inducir isotipos diferenciales de anticuerpos. Quil A se había utilizado comercialmente en una vacuna veterinaria contra la fiebre aftosa (Dalsgaard *et al.*, 1974). Quil A es un producto heterogéneo, que consta de hasta 23 picos de saponina diferentes detectables por HPLC, y que producen diferentes niveles de adyuvancia que podrían aprovecharse para producir adyuvantes útiles para vacunas.

Kensil y colaboradores estudiaron 10 picos de la fracción acuosa de *Q. saponaria*, donde se identificó la saponina correspondiente encontrando el pico QS-21 (Kensil *et al.*, 1991). Los estudios han demostrado que QS-21 promueve elevada respuesta de anticuerpos específicos de antígeno y de células T CD8⁺ en ratones y que favorece una producción equilibrada tanto de IgG1 como de IgG2a. También han demostrado que QS-21 estimula la producción de linfocitos T citotóxicos (CTL), induce citocinas Th1, interleucina-2 e interferón gamma (IL-2 e IFN- γ) y anticuerpos del isotipo IgG2a contra antígenos proteicos (Wang, 2021; Zhao *et al.*, 2023). Varios estudios comparativos han demostrado que QS-21 superó significativamente a otras clases de adyuvantes, incluidas formulaciones de glucanos, peptidoglicanos, copolímeros de bloque anfófilos, nucleósidos bacterianos y lipopolisacáridos bacterianos, en el aumento de las respuestas de anticuerpos, así como de las respuestas de las células T contra los antígenos diana.

Palatnik de Sousa y colaboradores sugieren que la proporción de isómeros conformacionales del aldehído triterpénico es crucial para la integridad de la respuesta adyuvante Th1 y parece que los aldehídos axiales son más importantes en la respuesta inmune humoral, mientras que los aldehídos ecuatoriales son más relevantes para la respuesta inmune protectora celular. La presencia del grupo aldehído en QS-21 podría explicar la mayor potencia de la respuesta humoral inducida por las formulaciones QS-21 del tipo Th1 IgG2a (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004).

Sin embargo, QS-21 es químicamente inestable en ambientes alcalinos, muestra actividad hemolítica *in vitro* y está asociada con dolor inmediato en el lugar de la inyección. Se informó que la fracción de ácido graso en QS21 es la responsable de la toxicidad evidente por la actividad hemolítica, la letalidad en ratones y la pérdida de cabello (Santos *et al.*, 2002). Ronnberg y colaboradores también demostraron que la reducción de la toxicidad de las saponinas de Quillaja se obtiene después de la degradación de la fracción de carbohidratos con el tratamiento con IO4Na (Ronnberg *et al.*, 1997).

El QS-21 libre se puede atenuar incorporándolo a partículas de colesterol, como se hace en el sistema adyuvante basado en liposomas 01 (AS01). La combinación de colesterol y fosfolípidos, como en complejos inmunoestimulantes (ISCOM) o Matrix-M nanopartículas. La formulación en nanopartículas permite apuntar a la entrega del adyuvante a las células fagocíticas, enfocando así la estimulación en las células apropiadas (Stertman *et al.*, 2023). El mecanismo de acción de las saponinas propone una activación del NLRP3 en células APC y posteriormente activa la caspasa 1 para promover la producción de formas activas de citocinas IL-1 β , IL-18, y I-L33. También se ha descubierto que QS-21 puede promover el escape endosómico y la presentación cruzada. En general, es un componente inmunoestimulante que induce una respuesta inmune predominante Th1 para promover la generación de LTc (Zhu *et al.*, 2016).

Se propone que QS21 produce poros en las membranas celulares mediante su interacción con colesterol, siendo este el mecanismo más probable que permite que las moléculas antigénicas presentes en la formulación vacunal ingresen al citoplasma, con la consecuente activación de Linf T citotóxicos, CTL. Por otra parte, QS21 favorece la producción de anticuerpos de tipo IgG2a y citoquinas del perfil Th1, como el IFN γ y la IL-2. Este adyuvante es uno de los más potentes y efectivos contra microorganismos intracelulares que requieren de respuesta inmune celular, que involucre a los Linf T citotóxicos (Wang, 2021).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se ha fortalecido la ganadería de los pequeños rumiantes de manera considerable, alcanzando valores de 8, 805, 206 ovinos y 8, 824, 664 caprinos según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (SIAP, 2024). La producción de Toneladas de carne se estimó con valores de 1 062.557 T (año 2022) - 1 056.573 T (año-2023) para ovinos y 45.61 T (año 2022)- 43.68 T (año 2023) para caprinos. Según el reporte de la población ganadera realizado por el SIAP en el 2022, el Estado de México realiza una importante labor ganadera de ovinos y caprinos, con una población de 1,362,453 y 119 815 cabezas de ganado respectivamente (SIAP, 2024).

Para mantener la producción de manera efectiva, es de sumo interés concertar planes de control de enfermedades, que incluyan el uso de vacunas para la prevención y bienestar animal. La Linfadenitis caseosa es una de las enfermedades que produce un impacto negativo en la salud pública y veterinaria, así como en la economía de la ganadería de ovinos y caprinos; y existen evidencias de su incidencia en el territorio mexicano (Ochoa *et al.*, 1996; Barrietos *et al.*, 1996; Carrillo *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2018; Parise *et al.*, 2018). Esta patología origina afectaciones que conllevan al deterioro continuo de la salud del animal, con disminución en la producción de lana, carne, leche, alteraciones en el sistema reproductivo y rechazo de canales y vísceras. Además, los animales quedan vulnerables a padecer infecciones por otros agentes patógenos debido al deterioro del sistema inmune y las lesiones que se generan fundamentalmente en pulmones y nódulos linfáticos mediastínicos lesionados. Como consecuencia se ve afectada la comercialización de los productos y la economía (Aleman y Spier, 2001).

A los animales enfermos se les aplica tratamiento con antibióticos; sin embargo, la condición intracelular de este patógeno aunado a la formación de piogranulomas y el tejido fibroso encapsulando los abscesos dificulta la acción de los antimicrobianos (Williamson, 2001). El uso indiscriminado e irracional de estos fármacos ha provocado un aumento de resistencia antimicrobiana, constituyendo un riesgo para la salud humana y veterinaria. Diversos estudios demuestran que las cepas de *C. pseudotuberculosis* presentan un perfil variable de resistencia antimicrobiana (Robaj *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018a). La evaluación *in vitro* de la resistencia antimicrobiana de cepas provenientes de diferentes hospederos, mostraron sensibilidad ante amoxicilina-clavulánico, ampicilina, cefotaxima, cefoxitina, ciprofloxacino, clo-ranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, imipenem, kanamicina, norfloxacin, penicilina, rifampicina, tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol y vancomicina por el método de difusión. Aplicando el método de dilución fueron activos los antimicrobianos de los grupos de cefalosporinas, gluco-péptidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclina, siendo menos efectivos los β -lactámicos y aminoglucósidos (Gallardo *et al.*, 2019).

Las vacunas brindan protección y ofrecen ventajas para el control y erradicación de la enfermedad, así como también evitan el uso de los antimicrobianos. Mediante la inmunización, el hospedero, puede desarrollar los mecanismos destinados a la eliminación del patógeno, así como activación de la memoria inmunológica. Las vacunas juegan un rol esencial ya que proveen control profiláctico ante las enfermedades. Existen vacunas comerciales y experimentales destinadas al control de LAC, pero estas confieren niveles de protección variable en los rebaños (de Pihno *et al.*, 2021). Las vacunas comerciales brindan protección asociada principalmente con la inducción de la respuesta humoral mediada por las inmunoglobulinas Ac anti-PLD, los cuales protegen contra el daño tisular y la diseminación del microorganismo; sin embargo, es una protección parcial ya que se requiere de una respuesta inmune mediada por células para eliminar las bacterias intracelulares (Bastos *et al.*, 2012).

En México las vacunas comerciales aún no están disponibles, por ello existe la necesidad de trabajar en el desarrollo de una vacuna, a partir de aislados autóctonos, que permita una protección completa y eficaz. En este sentido en diferentes zonas del país se evaluó una vacuna de tipo bacterina-toxoide, con base a una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislada en México, de origen ovino. Las regiones incluidas en el estudio para la evaluación del formulado vacunal fueron Veracruz, Puebla y Yucatán. Se incluyeron 8 unidades de producción ovina donde 600 animales fueron inmunizados. En estas granjas se había reportado la enfermedad previamente con un 6% de animales afectados. Los resultados mostraron una diferencia en el título de anticuerpos entre los animales vacunados y no vacunados, e incrementaron esta diferencia entre grupos al ser expuestos a la bacteria causante de la LAC, por vía subcutánea y vía aerógena. Sin embargo, se desarrollaron pequeñas lesiones, en el sitio donde se inoculó la bacteria y la incidencia (número de casos nuevos después de la vacunación fue del 1.5% en un lapso de dos años de iniciado el programa de vacunación (Murgía-Olmedo y Morales-Álvarez, 2017). Los resultados indican que la vacuna desarrollada es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en los ovinos, pero al ser una vacuna convencional aun presenta desventajas, como la formación de abscesos no deseados. Es por ello que se continúa investigando para el desarrollo de un formulado vacunal que permita un control eficaz, siendo las vacunas de subunidades recombinantes una opción alentadora para el control de la LAC.

IV. JUSTIFICACIÓN

El control y erradicación de Linfadenitis Caseosa constituyen un reto para la industria ganadera que tiene como objetivo incrementar la producción en los próximos años. Existen vacunas inactivadas, multicomponentes y con fracciones de exoproteínas contra *C. pseudotuberculosis* que son usadas principalmente en países desarrollados (de Pinho *et al.*, 2021); sin embargo, estas no han logrado una respuesta inmune satisfactoria, así como tampoco se comercializan en México.

Los criterios de selección de posibles candidatos vacunales dependen de múltiples factores, siendo uno de ellos las moléculas o antígenos con potencial inmunogénico, que deben presentar características que influyan de manera positiva en la activación del sistema inmune. Para el desarrollo de vacunas seguras y eficaces se requiere de la evaluación de estos formulados en modelos experimentales para garantizar la calidad de los mismos. Las vacunas de subunidades permiten el uso de diferentes antígenos que combinados con adyuvantes confieren inmunidad específica y segura. La investigación sobre vacunas apunta cada vez más a comprender los mecanismos fundamentales de protección que brindan las vacunas candidatas.

De las vacunas autorizadas usualmente se reporta el comportamiento de la respuesta humoral para proporcionar correlatos de protección, pero la identificación de la inmunidad celular es importante para la protección frente a patógenos intracelulares como *C. pseudotuberculosis*. Los indicadores para evaluar la respuesta inmune inducida por vacunas contra LAC, incluyen medición de los títulos de anticuerpos y la respuesta celular (Bastos *et al.*, 2012). Medir la respuesta de células B y T se ha hecho necesario y si bien diversos ensayos pueden proporcionar esta información, la Citometría de flujo permite evaluar simultáneamente las características de las respuestas celulares. Es de suma importancia el desarrollo de una vacuna de producción nacional y las formulaciones vacunales de subunidades proteicas son una alternativa eficaz, y para ello la evaluación de la respuesta inmune que estas inducen es fundamental para establecer sus mecanismos de acción y su potencial inmunoprotector.

V. HIPÓTESIS

La vacuna de subunidades basada en las proteínas recombinantes PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* es capaz de inducir una respuesta inmune específica humoral y/o celular en un modelo murino.

VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune de la vacuna de subunidades (PLD y CP40) contra *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* en un modelo murino.

VI.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Predecir *in silico* la actividad inmunogénica de la vacuna de subunidades recombinantes PLD y CP40.
- Determinar la dosis letal de la vacuna de subunidades PLD y CP40 en el modelo murino.
- Evaluar *in vivo* la respuesta inmune humoral y celular de la vacuna subunidades recombinantes PLD y CP40 en ratones BALB/c.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Límite de Espacio y Tiempo.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México. El CIESA se localiza en el kilómetro 12.5 de la carretera Panamericana en su tramo Toluca–Atlacomulco. La investigación se efectuó en un periodo de tiempo comprendido desde el 1 de enero del 2021 al 1 de Mayo del 2024.

VII.2 Predicción *in silico* de la actividad inmunogénica de las proteínas PLDr y CP40r derivadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L.

Para determinar la red de interacción entre las proteínas PLDr y CP40r se utilizó el programa bioinformático String (<https://string-db.org/>), empleando las secuencias de aminoácidos derivadas de las secuencias de nucleótidos de los genes *pld* (acceso: OL347711) y *cp40* (acceso: OL347712), de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado 2J-L de origen mexicano. Se establecieron como parámetros la detección de 20 y 50 interacciones, para un valor de corte de 0.7, valorado como de alta confianza. El programa identificó interacciones entre proteínas teniendo en cuenta asociaciones reportadas en bases de datos derivadas de experimentos o predicciones previas, según interacciones físicas o funcionales (Franceschini *et al.*, 2013). La interface web IEDB (<http://www.iedb.org.com>) se empleó para la predicción de epítomos de células T CD8⁺ en el contexto del MHC-I del modelo murino (alelos: H-2-Kb, H-2-Kd, H-2-Kk, H-2-Db, H-2-Dd, H-2-Ld, H-2-Qa1, H-2-Qa2 utilizando el método NetMHCpan EL 4.1 para un valor de corte de 0.5. Los epítomos de células T CD4⁺ presentados en el contexto del MHC-II (alelos: H2-IAb, H2-IAd, y H2-Ied) se estimaron utilizando el método NetMHCII-pan 4.1 para un valor de corte de 0.5. También se utilizó el programa C-ImmSim (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/index.php?page=1>) (Rapin *et al.*, 2010) para simular la respuesta inmune (producción de IgG1 e IgG 2, Linf B, Linf T, Macrófagos y perfil de Citoquinas) ante la aplicación de las moléculas PLD y CP40. Se ingresaron en el programa las secuencias de las proteínas PLD (UniProt: P20626) y CP40 (UniProt: A0A1J0KIS5), estableciendo como parámetros dos dosis separadas de 21 días y el uso de un adyuvante hipotético y 60 días como punto final del experimento.

VII.3 Microorganismos.

Escherichia coli cepa BL21 (DE3) con genotipo [F'ompT [lon] hsdSB (rB- mB-)] que porta un profago λ que contiene el gen de la ARN polimerasa del fago T7, transformadas con los

plásmidos pET28a-pld 2J-L y pET28a-cp40 2J-L se utilizaron para la expresión de las proteínas recombinantes PLD y CP40 derivadas del aislado mexicano *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* 2J-L (Rodríguez-Domínguez, 2020). Para el estudio de desafío de los animales vacunados se utilizó la cepa de referencia *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* ATCC 43926, también identificada como *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Buchanan) Ebersson, originalmente designada como cepa 169, obtenida de un absceso formado en un nódulo linfático ovino (ATCC, 2024).

VII.4 Modelo experimental Murino, ratones BALB/c.

La vacuna se evaluó en el modelo animal experimental murino, ratones BALB/c, que fueron donados por SENASICA, Dirección General de Salud animal, Bioterio de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales. Se utilizaron animales hembras y machos, de 6-8 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en el bioterio del CIESA, en jaulas individuales, separados por grupos experimentales, durante el período de ensayo, con una dieta comercial y agua *ad libitum*, bajo régimen de luz y oscuridad de intervalos de 12 horas. Todos los ensayos evaluados en el modelo experimental murino se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, 2017), la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, y la NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014: Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. El protocolo de investigación fue evaluado por el Comité de Bioética de Investigación del programa de posgrado (PCARN), y fue aprobado bajo el Código de asignación: 06-DIC-2021-1.

VII.5 Obtención de las proteínas recombinantes PLD y CP40 en el sistema de expresión heterólogo *Escherichia coli* BL21 DE3.

Los clones recombinantes de *E. coli* BL21 DE3 transformados con los plásmidos pET28a-pld 2J-L y pET28a-cp40 2J-L (Rodríguez-Domínguez, 2020) se sembraron en placas de agar Luria Bertani (LB) suplementadas con kanamicina (50µg/mL). De cada clon recombinante se sembró por separado una colonia aislada en 20mL de medio líquido LB y se incubó durante 16 horas a 37°C, en agitación a 210 rpm. Posteriormente se transfirió el inóculo a un matraz de 300 mL de medio líquido estéril LB con kanamicina (50µg/mL) y se incubó a 37°C, en agitación a 210 rpm BENCHTOP Shaking Incubator 222 DS, Labnet International, Inc). Cuando el cultivo alcanzó una absorbancia DO (600 nm) entre 0.7-0.8, se procedió a realizar la inducción de la expresión de las proteínas añadiendo el Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1mM y se mantuvo la incubación por 7 horas. Una vez terminada la fermentación, la biomasa fue recuperada mediante centrifugación a 10,000 g

por 20 min. Se verificó la expresión de las proteínas recombinantes mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15% (m/v).

VII.6 Electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS- PAGE).

La separación de proteínas según su talla molecular se realizó mediante geles de poliacrilamida al 15%, SDS-PAGE en condición reductora. Se utilizó la solución de aplicación 2X [SDS 6% (p/v), bromofenol azul 0,05% (p/v), glicerol 20% (v/v), Tris-HCl 125 mM, β -mercaptoetanol 10% (v/v), pH 6,8], la cual se calentó a 95°C junto a 10 μ L de la muestra, durante 10 min, según lo descrito por (Laemmli, 1970). Se utilizó como patrón de proteínas el Bluestain 2 Protein Ladder, Goldbio (5-245KDa). En todos los análisis por SDS-PAGE se emplearon geles al 15 % (m/v). Las electroforesis se realizaron a 80V y se empleó el tampón de corrida de proteínas [Glicina 1,92 M, Tris base 0,25 M, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3]. La visualización de las bandas se logró mediante la incubación del gel en solución de tinción [azul de Comassie 0,05% (p/v), metanol 10% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] durante 20 min a temperatura ambiente, con agitación. Posteriormente, se hicieron lavados sucesivos con solución de desteñir [metanol 10% (v/v), ácido acético 10% (v/v)], en agitación hasta obtener un contraste apropiado de las bandas.

VII.7 Purificación de las proteínas recombinantes PLD y CP40 mediante Cromatografía de Afinidad.

La purificación de las proteínas se realizó mediante cromatografía con el kit QIAexpress® Ni-NTA Fast Start protein purification system, (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. La biomasa recuperada de la fermentación de 300mL se resuspendió en 10 mL de tampón de Lisis Desnaturalizante, se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 60 min, agitando de 2 a 3 veces suavemente la suspensión celular. Posteriormente se centrifugó el lisado a 12,000 xg durante 30 min y se conservó el sobrenadante del lisado celular (se conservaron a -20°C 50 μ L de muestra de lisado celular para su posterior análisis por electroforesis de proteínas). Una vez resuspendida la resina en la columna, se drenó el buffer de almacenamiento y se añadió el sobrenadante del lisado celular. Luego se lavó la columna 2 veces con 4 mL de tampón de Lavado Desnaturalizante y ambas fracciones de lavado fueron recolectadas y almacenadas a -20°C. Se conservaron a -20°C 50 μ L de muestra pasada a través de la columna, muestra de los lavados y de la elusión 1 y 2 para su posterior análisis por electroforesis de proteínas. La elusión de las proteínas recombinantes marcadas con 6xHis se realizó 2 veces adicionando 1mL de tampón de Elusión Desnaturalizante, siendo cada elusión colectada por separado. Se conservaron a -20°C muestras (50 μ L) de la fracción de lisado celular pasado a través de la columna, las

fracciones de los lavados y las eluciones para su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%.

VII.8 Cuantificación de las proteínas recombinantes PLD y CP40 por el método del ácido bicincoínico.

La concentración de las proteínas se determinó según el método del ácido bicincoínico (Smith *et al.*, 1985), con el empleo del juego de reactivos BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc. EE.UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de poliestireno (Costar, Corning, NY, EE.UU) y se añadieron por duplicado 25µL de cada muestra de la curva patrón o de las proteínas a cuantificar. Posteriormente se adicionaron 200µL de la solución de trabajo (WR: 50:1 de reactivo A: B, 50mL de A por 1mL de B), se mezcló mediante agitación durante 30 seg y se incubó 37°C durante 30 min. Luego se midió la absorbancia a 562 nm en un Espectrofotómetro para placas (Epoch BioTek, EE.UU) acoplado al programa informático Gen5 versión 2.01. Para la elaboración de la curva patrón se utilizaron soluciones de proteína Albumina Sérica Bovina (BSA) de concentraciones conocidas abarcando un rango de trabajo de 25–2000µg/mL (Cuadro 3). La curva patrón se elaboró utilizando la medición promedio de absorbancia a 562 nm para cada solución de BSA *versus* su concentración en µg/mL. Los resultados fueron analizados en Microsoft Excel, donde se realizó una correlación lineal entre los valores de la curva patrón y se determinó la ecuación de la curva, con la cual posteriormente teniendo los valores de DO de las muestras problemas se determinó la concentración de la proteína de cada muestra desconocida.

Cuadro 3. Curva Patrón para la cuantificación de proteínas basada en concentraciones conocidas de BSA (2mg/mL).

Viales	Volumen diluyente (µL)	Volumen de BSA (µL)	Concentración Final (µg/mL)
A	0	300	2,000: 2mg/mL
B	125	375	1,500 µg/mL
C	325	325	1000 µg/mL
D	175	175 del vial B	750 µg/mL
E	325	325 del vial C	500 µg/mL
F	325	325 del vial E	250 µg/mL
G	325	325 del vial F	125 µg/mL
H	400	100 del vial G	25 µg/mL
I	400	0	0

VII.9 Formulación de los candidatos vacunales.

La vacuna de subunidades se desarrolló a partir de las proteínas PLDr y CP40r obtenidas por vía recombinante. Las proteínas (50µg) se utilizaron por separado y en un formulado que incluyo a ambas, en todos los casos en combinación con el adyuvante Saponina (Sigma Aldrich, EE.UU) (3.5µg). Para la determinación de la dosis letal de la vacuna, las proteínas recombinantes se utilizaron sin tratamiento de inactivación e inactivadas mediante tratamiento térmico, 96°C durante 15 min. Los lotes experimentales de la vacuna de subunidades fueron analizados para la determinación de posibles contaminantes bacterianos. Se emplearon 3 muestras de 200µL, para su siembra en medio Luria Bertani, Caldo Triptona Soya y Agar sangre, con incubación a 37°C por un periodo de 24-48 h.

VII.10 Determinación de la dosis letal de la vacuna de subunidades PLDr y CP40r en el modelo murino.

La Dosis Letal Media (DL50) y la Dosis Letal Máxima (DL100) de la vacuna de subunidades recombinantes PLDr y CP40r se evaluó en el modelo murino, ratones BALB/c, inoculados con diferentes dosis para establecer la cantidad de muertes en un período de tiempo determinado, método de Reed y Muench modificado (Saganuwan, 2011). Fueron analizadas diferentes dosis, 50 µg de cada proteína, sin tratamiento de inactivación y 25 µg y 50 µg de cada proteína con tratamiento de inactivación por método térmico, 96°C durante 15 min. Se utilizaron para cada evaluación 5 grupos (10 animales c/u): Grupo 1, animales inoculados con PBS; Grupo 2, animales inoculados con Saponina (7.5µg o 3.5µg); Grupo 3, animales inoculados con PLDr - Saponina; Grupo 4, animales inoculados con CP40r - Saponina; Grupo 5, PLDr - CP40r- Saponina. Se administraron 200µL de los preparados vacunales o PBS, por vía subcutánea, dos inoculaciones separadas de 21 días. El cálculo de la DL50 y DL100 se realizó mediante el método aritmético, utilizando las distintas dosis y los niveles de respuesta, en este caso % de letalidad, para realizar un gráfico de dispersión (relación entre las dos variables dosis / % letalidad). Posteriormente utilizando la ecuación del gráfico se calculó para un valor de 50% o 100% de Letalidad la dosis correspondiente.

VII.11 Reactivación de la virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 utilizada para el desafío de los animales vacunados.

Corynebacterium pseudotuberculosis ovis cepa ATCC 43926 se cultivó en agar sangre, (40g/L de base agar sangre y 25mL de sangre de ovino), incubada a 37°C durante 24-48 h en condiciones de microaerofilia. Luego se inocularon colonias puras y aisladas en 20mL de medio líquido Infusión Cerebro-Corazón, BHI (37g/L), durante un periodo de incubación de 48 a 72 h a 37°C. La suspensión celular se tituló tomando como referencia lo establecido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994: Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico y la NORMA Oficial

Mexicana NOM-092-SSA1-1994: Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Se realizaron diluciones seriadas en base a 10 (de 1/10 hasta 1/10⁶) en volumen final de 1mL. Posteriormente las diluciones se sembraron en placas de agar BHI y se incubaron 24h a 37°C en condiciones de microaerofilia. Seguido del periodo de incubación se realizó el conteo de colonia en un Contador de colonias (Fe-500 Felisa, México). La Norma Mexicana NOM-092-SSA1-1994 establece como Dilución aceptable de 25-250 colonias en la placa y el resultado se expresó en UFC/mL. La reactivación de la virulencia se realizó con un total de 6 animales (ratones BALB/c), mantenidos en el bioterio del CIESA, en jaulas individuales por grupo durante el período de ensayo. Se definieron 2 grupos de animales, cada uno con 3 ratones, para evaluar dos títulos (10⁴ y 10⁶) del cultivo de *C. pseudotuberculosis* cepa ATCC 43926, administrados mediante inoculación vía intraperitoneal (200µL). Se evaluó el desarrollo de lesiones características de la enfermedad como abscesos en el sitio de inoculación y en órganos internos. Después de un periodo de 15 días los animales fueron anestesiados con Pentobarbital sódico (50-70 mg/Kg de peso), vía intraperitoneal y sometidos a eutanasia mediante dislocación cervical. Se realizó el aislamiento de la cepa virulenta ATCC 43926 a partir de muestras de los abscesos, cutáneos y órganos (pulmones, hígado, bazo o riñones). Los hisopados de abscesos y órganos fueron sembrados en medio agar sangre, incubados a 37°C durante 48h, en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se aislaron las colonias con características morfológicas indicativas de *C. pseudotuberculosis* (blancas-grisáceas redondas, secas, producción de hemólisis), se cultivaron en medio caldo BHI y posteriormente se realizó su conservación en medio BHI + glicerol 25%. La identificación molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* obtenida de las muestras se realizó mediante PCR Cuádruplex (Almeida *et al.*, 2017).

VII.12 Esquema de vacunación y desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*.

Todos los experimentos se realizaron en el Bioterio del CIESA, donde los animales se mantuvieron en jaulas individuales separados por grupos experimentales durante el período de ensayo. El experimento se realizó con 6 grupos: Grupo 1 animales inoculados con PBS; Grupo 2 animales inoculados con Saponina (3.5µg); Grupo 3 animales inoculados con PLDr (50µg) – Saponina (3.5µg); Grupo 4 animales inoculados con CP40r (50µg) – Saponina (3.5µg); Grupo 5 PLDr (50µg) - CP40r (50µg) – Saponina (3.5µg) y Grupo 6 animales desafiados con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926. Se administraron 200µL de los formulados vacunales o PBS para grupos controles, por vía subcutánea, 2 dosis separadas de 21 días. Luego de 21 días de aplicada la segunda dosis de la vacuna todos los grupos excepto el Grupo 1 fueron desafiados vía intraperitoneal con 200 µL de 10⁴ UFC/mL de la cepa virulenta ATCC 43926 (Figura 6). El examen clínico de los animales se realizó durante todo el experimento, el cual incluyó evaluación de la condición

corporal, formación de abscesos subcutáneos, alopecia, fistulas o exudados en el sitio de inoculación. Durante el proceso de inmunización y desafío, según el esquema Figura 6, en diferentes tiempos del experimento se tomaron muestras de sangre de 6 animales de cada grupo para el análisis de la respuesta humoral mediante inmunoensayo enzimático de tipo ELISA. También de cada 3 animales por grupo se tomaron muestras de abscesos (en caso de desarrollo de este tipo de lesión característica de la LAC), piel (sitio de inoculación o desafío), y órganos (bazo, riñones, hígado, corazón y pulmones) para el análisis de los tejidos por histopatología y el bazo para evaluación de la respuesta inmune celular mediante Citometría de Flujo.

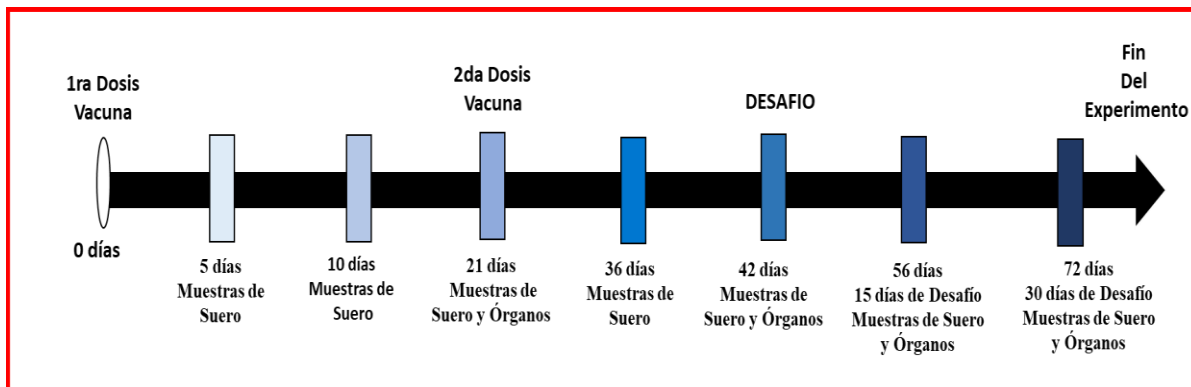


Figura 6. Esquema de Inmunización y Desafío de los grupos experimentales. Las barras representan los tiempos establecidos para la inmunización, desafío y toma de muestras.

VII. 13 Análisis Histopatológico

Se realizó el estudio histopatológico de muestras de: pulmón, bazo, riñón, corazón, hígado así como posibles lesiones (abscesos) del sitio de inoculación y sitio de desafío. Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10%, fueron incluidas en parafina, y seccionadas (5 μ m), para realizar tinción con hematoxilina y eosina en portaobjetos, según las técnicas histológicas de (Mahmood, 2015). Las lesiones indicativas de cambios patológicos serán: edema, congestión, hemorragia, inflamación, degeneración, necrosis, hiperplasia. Se estableció una clasificación para indicar el grado de las lesiones: Sin cambios patológicos aparentes (SCPA), lesión leve (lev), lesión moderada (Mod), lesión severa (Sev).

VII.14 Evaluación de la respuesta inmune humoral (IgG Totales) mediante la técnica de ELISA.

Para la normalización del sistema ELISA se aplicó un diseño de tablero de ajedrez donde se probaron 2 concentraciones de los antígenos PLDr y CP40r (2.5 μ g/mL y 3.5 μ g/mL) contra diluciones seriadas de un suero control positivo (1:20; 1:50; 100; 1:200) y un suero control negativo. Se determinó la curva ROC para establecer el valor de corte con el programa Medcalc versión 22.007. Para el desarrollo de la técnica se utilizaron micro placas de

poliestireno de 96 pocillos (Costar, Corning, NY, EE.UU) las cuales fueron sensibilizadas con 100 µL de cada proteína (3.5 µg/mL) por separado y combinadas, diluidas en buffer de carbonato 5.3% Na₂CO₃, pH 9.6 (Sigma-Aldrich, USA), siendo incubadas durante 24h a 4°C. Luego se realizaron cuatro lavados con 200 µL de PBS y Tween 20 al 0.05% (PBS-T) y seguidamente se realizó el bloqueo con 100 µL de leche descremada (Difco, USA) al 2% por una 1h a 37°C. Luego del bloqueo se realizaron cuatro lavados con 200 µL de PBS-T dejando secar y por último las placas se almacenaron a 4°C cubiertas con aluminio hasta su utilización. Se agregaron 100 µL de una dilución 1:20 en PBS de los sueros problemas (anticuerpos primarios) realizando una incubación de 1h a 37°C para posteriormente realizar cuatro lavados con 200 µL de PSB-T. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG ratón conjugado a enzima peroxidasa (Anti-Mouse IgG HRP Conjugated Antibody, ABM, EE. UU) en una dilución 1:1000 incubándose por 1h a 37°C, seguido de cuatro lavados con 200 µL PBS-T. Finalmente se agregaron 50 µL de 3,3', 5, 5' - tetramethylbenzidine (KPL SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate, Sure) y se incubó en la oscuridad por 15 min. La lectura se realizó a una longitud de onda de 450nm en un Espectrofotómetro para placas (Epoch BioTek, EE.UU) acoplado al programa informático Gen5 versión 2.01.

VII.15 Fenotipificación de las poblaciones celulares (Linf B, Linf T y Monocitos) del Bazo mediante Citometría de Flujo

Las poblaciones celulares de Linf B, Linf T y Monocitos fueron analizadas mediante Citometría de Flujo, a partir de muestras del Bazo de 3 animales de cada grupo experimental en diferentes tiempos del ensayo. Del Grupo 1 al 5 se analizaron las muestras de animales de los tiempos 21, 42 y 72 días del esquema experimental. Los bazos fueron depositados en placas Petri donde se adicionó 1.5 mL de solución FACS Lysing 1X (BD, Biosciences, EE. UU) para la lisis de los eritrocitos, mientras fueron disgregados mediante macerado. Se adicionó a la suspensión celular resultante de la disgregación medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, EE.UU) (2mL). Una vez concluido el proceso se colectó el volumen total de la placa Petri y se adicionó a un tubo de 15 mL donde se realizaron 3 lavados con PBS 1X-SFB al 2% y centrifugación 1500 g por 10 min. Finalmente se realizó conteo celular en cámara de Neubauer y la suspensión celular se ajustó a 10⁶ células/mL. Para el marcaje de las poblaciones celulares se utilizaron 2 tubos por cada muestra para 2 Marcajes, cada uno con 100 µL de suspensión celular, donde se agregaron los anticuerpos según lo indicado en el Cuadro 4, y se incubaron 25 min a temperatura ambiente. Luego de la incubación con los anticuerpos se realizaron 3 lavados con PBS 1X-SFB al 2%, se centrifugaron a 1500 g por 10 min y se fijaron las muestras con 200 µL de paraformaldehído al 1%.

Para la lectura se utilizó el Citometro de flujo MACSQuant 16 (Miltenyi Biotec, EE.UU), el cual cuenta con tres láseres acoplados, con 6 canales para el Violeta, 7 canales para el Azul

y 3 canales para el Rojo. Los voltajes para las lecturas se eligieron utilizando en cada detector esferas de calibración 130-093-607 MACSQuant Calibration Beads (Miltenyi, EE.UU). De cada fotomultiplicador se escogió el voltaje mínimo con el que se lograba la máxima separación señal-ruído y el mínimo coeficiente de variación entre las lecturas de cada muestra de compensación, dentro del rango de linealidad de cada detector. Las muestras para la compensación consistieron en suspensión celular del bazo de animales sanos marcadas con cada uno de los fluorocromos por separados. Posteriormente se procedió a la captura de las muestras, fijando 10,000 eventos. Los datos se analizaron en el programa MACSQuantify™ Software (Miltenyi, EE.UU) donde se generaron los gráficos de dotplot y se determinó el conteo y el porcentaje celular de las diferentes poblaciones analizadas.

Cuadro 4. Especificaciones de los anticuerpos para la fenotipificación de células del sistema inmune en el bazo mediante Citometría de Flujo.

Marcajes	Anticuerpos	Concentración	Vol cada 100µL de células	Molécula- Células	Fluorocromo
Marcaje 1	CD3 Antibody clon REA641, Miltenyi Biotec	30 µg /200 µL	2 µL	CD3- Linfocitos T	PerCP-Vio 700
	CD4 Antibody clon GK 1.5, Miltenyi Biotec	150 µg/mL	2 µL	CD4- Linfocitos T (Th)	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
	CD8a Antibody clon 53-6.7, Miltenyi Biotec	30 µg/mL	10 µL	CD8- Linfocitos T (Tc)	Ficoeritrina (PE)
Marcaje 1 y 2	CD45 Antibody clon 30-F11, BD	100 µg/mL	1 µL	CD45- Leucocitos	Alofocianina (APC)
Marcaje 2	CD19 Antibody clon REA749, Miltenyi Biotec	30 µg /200 µL	2 µL	CD19- Linfocitos B	PerCP-Vio 700
	CD14 Antibody clon REA934, Miltenyi Biotec	150 µg/mL	2 µL	CD14- Monocitos	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

VII.16 Análisis Estadístico

La estandarización del sistema ELISA se realizó mediante la elaboración de las curvas ROC y los valores de corte generados utilizando el punto de máxima especificidad y sensibilidad combinadas para cada curva ROC. El porcentaje de supervivencia de los animales vacunados y desafiados se calculó dividiendo el número de animales muertos por el número total de animales de cada grupo y se utilizó el programa Medcalc versión 22.007 para realizar la curva mediante el método Kaplan Meier para una cinética de mortalidad de 30 días. El análisis estadístico para establecer diferencias significativas entre los diferentes grupos

experimentales (formulados vacunales) en los diferentes tiempos del ensayo con relación a la producción de anticuerpos IgG totales y el conteo de células del sistema inmune presentes en el bazo, se realizó aplicando una prueba de ANOVA seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$), calculado con el programa R (Calcina *et al.*, 2023).

VIII. RESULTADOS

VIII. 1. Predicción *in silico* de la actividad inmunogénica de las proteínas recombinantes PLDr y CP40r derivadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L.

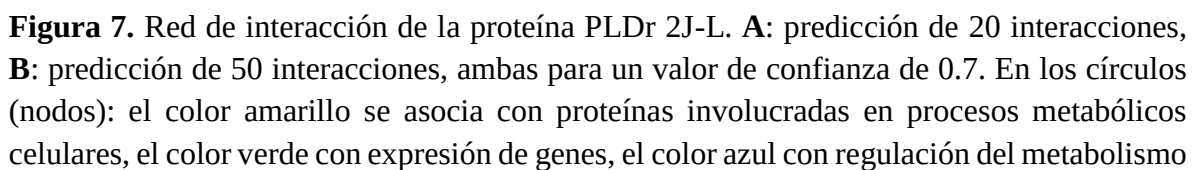
VIII.1.1 Red de interacción de las proteínas recombinantes PLDr y CP40r de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L.

Las redes de interacción entre las proteínas PLDr (Figura 7) y CP40r (Figura 8) de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L fueron determinadas *in silico* con el programa String. Del análisis realizado para la proteína PLDr con parámetro de 20 interacciones se identificaron proteínas con mayor valor de confianza (score) y con relación de co-ocurrencia filogenética (representado en la red por la línea azul): proteína nanH, relacionada con actividad enzimática neuroaminidasa (score: 0.797), ADL11374.1, proteína con repeticiones de serina-aspartato (score: 0.767) y sdrD, proteína con repeticiones de serina-aspartato (score: 0.761). También se identificó relación de tipo mención en textos científicos (línea amarilla) con proteínas del operón Fag ABCD, involucradas en la adquisición de hierro (score: 0.74) (Figura 7A).

El análisis ampliado para la detección de 50 interacciones (Figura 7B), permitió la identificación de una red entre 32 proteínas, donde se señala la interacción con el péptido serine proteasa, pepD, de tipo mención en textos científicos (línea amarilla). Por su parte, pepD, estableció interacción con otras proteínas de la red, según la función biológica asociada con procesos metabólicos celulares (nodo amarillo), expresión de genes (nodo verde), regulación del metabolismo celular (nodo azul) y regulación de actividad endopeptidasa (nodo rojo) (Figura 7B). El Cuadro 5 contiene la información de 22 proteínas relacionadas con PLDr en la red de interacción con parámetros de 20 y 50 interacciones, para un valor de confianza (score) de 0.7.

El análisis de la red de la proteína CP40r con parámetro de 20 interacciones indicó que esta establece relación de mayor valor de confianza (score) y con de co-ocurrencia filogenética (representado en la red por la línea azul) con: potC, proteína permeasa transportadora de hierro (score: 0.77), AIG11749.1, proteína con dominio de cutinasa (score: 0.763) y AIG12429.1, endonucleasa proteína integral de membrana (score: 0.761). Por su parte el análisis ampliado para la detección de 50 interacciones no aumento la red de interacción de proteínas para CP40r, siendo limitada la información a 20 interacciones.

El Cuadro 6 contiene la información de 17 proteínas presentes en la red de interacción con CP40r con parámetro de 20 interacciones y valor de confianza (score) entre 0.5 y 0.7.



celular, el color rojo con regulación de actividad endopeptidasa y el color gris: no asociación o función establecida. En las líneas: el color amarillo se asocia con: citado en un mismo texto científico, el color azul oscuro: Co-ocurrencia filogenética, verde: genes cercanos en el cromosoma, rojo: genes fusionados, negro: co-expresión de proteínas, gris: proteínas homologas, azul claro: anotación en bases de datos y magenta: proteínas relacionadas experimentalmente.

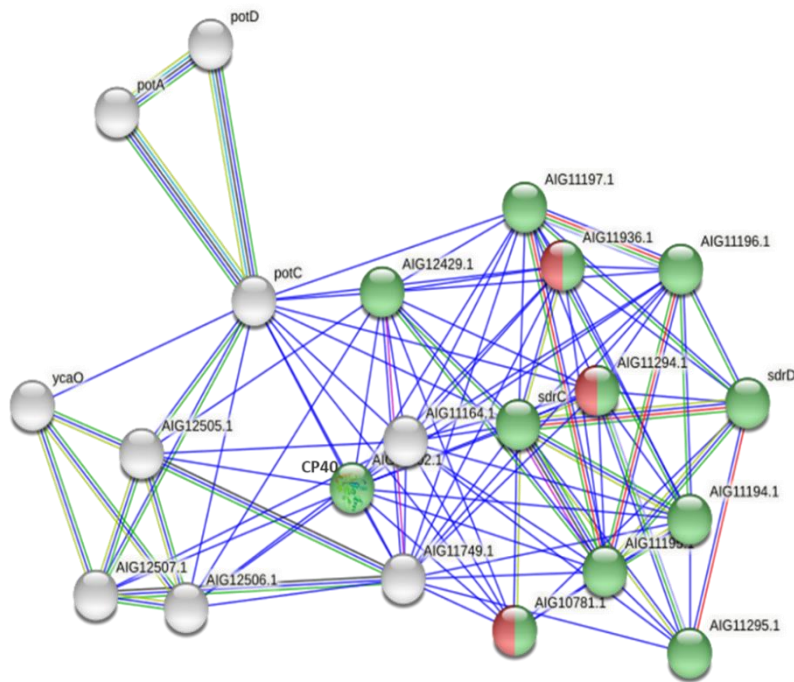


Figura 8. Red de interacción de la proteína CP40r en relación con 20 interacciones para un valor de confianza de 0.7. En los círculos: el color verde se asocia con unión a dominios de IgG, el color rojo dominios de adhesión y el color gris: no asociación o función establecida. En las líneas: el color amarillo se asocia con: citado en un mismo texto científico, el color azul oscuro: Co-ocurrencia filogenética, verde: genes cercanos en el cromosoma, rojo: genes fusionados, negro: co-expresión de proteínas, gris: proteínas homologas, azul claro: anotación en bases de datos y magenta: proteínas relacionadas experimentalmente.

VIII.1.2 Predicción de epítomos de Linfocitos T de las proteínas PLDr y CP40r presentados en el contexto del MHC-I y MHC-II.

La capacidad de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para activar los Linfocitos T se evaluó *in silico* en el contexto de la presentación de antígenos por parte de las moléculas MHC clase I (Linf T CD8⁺) y MHC clase II (Linf T CD4⁺).

Cuadro 5. Proteínas de la red de interacción de PLDr evaluada *in silico* con el programa String, con parámetros de 20 - 50 interacciones y valor de confianza (score: 0.7).

Nodo	Proteínas	Co-ocurrencia filogenética	Textos científicos	Score Total
nanH	Neuroaminidasa sialidasa	0.253	0.74	0.797
ADL11374.1	No caracterizada	0.767	0	0.767
sdrD	Repeticiones de serina-aspartato	0.761	0	0.761
ADL09668.1	Antígeno de Superficie	0.755	0	0.755
ADL11295.1	Repeticiones tetratricopéptido	0.754	0	0.754
ADL10558.1	TPR_2	0.753	0	0.753
ADL11259.1	Repeticiones dominio Big_8	0.752	0	0.752
ADL11409.1	Proteína con dominio LPxTG	0.741	0	0.741
nanL	Dihidro dipicolinato sintetasa	0	0.74	0.74
fagC	Proteína de membrana de unión a ATP	0	0.74	0.74
fagB	Transportador hierro-enterobactina	0	0.74	0.74
fagD	Fijadora de sideróforos de hierro	0	0.74	0.74
pepD	Proteasa de Serina	0	0.74	0.74
rpoB	Subunidad β ARN polimerasa	0	0.74	0.74
rplD	Proteína L4 50S ARNr	0	0.74	0.74
ADL10384.1	Proteína con dominio de cutinasa	0.719	0.084	0.732
ADL09662.1	No caracterizada	0.73	0	0.73
ADL11308.1	Familia Sdr relacionada con adesinas	0.726	0	0.726
ADL11339.1	No caracterizada	0.678	0.183	0.726
ADL09546.1	Superfamilia Mayor facilitador	0.723	0	0.723
ADL11147.1	Proteína con dominio LPxTG	0.72	0	0.72
ADL11258.2	No caracterizada	0.718	0	0.718

Cuadro 6. Proteínas de la red de interacción de CP40r evaluada *in silico* con el programa String, con parámetros de 20 interacciones y valor de confianza (score: 0.5-0.7).

Nodo	Proteínas	Co-ocurrencia filogenética	Puntuación total (score)
potC	Permeasa transportadora de hierro	0.77	0.77
AIG12429.1	Endonucleasa	0.761	0.761
AIG12506.1	Proteína no caracterizada	0.762	0.762
AIG11749.1	Proteína con dominio de cutinasa	0.763	0.763
AIG11164.1	Proteína Integral de membrana	0.753	0.753
AIG10781.1	Antígeno de Superficie	0.752	0.752
AIG11294.1	Proteína con dominio Big 8	0.75	0.75
AIG11936.1	Proteína con dominio Big_8	0.75	0.75
AIG11197.1	Proteína de anclaje a superficie	0.75	0.75
AIG11196.1	Proteína de anclaje a superficie	0.746	0.746
sdrC	Proteína con repeticiones de serina-aspartato	0.746	0.746
AIG11195.1	Proteína de anclaje a superficie	0.721	0.721
AIG12507.1	proteína con dominio C	0.721	0.721
AIG12505.1	Nitroreductasa	0.716	0.716
AIG11194.1	Proteína de anclaje a superficie	0.708	0.708
AIG11295.1	Proteína no caracterizada	0.693	0.693
ycaO	Proteína no caracterizada	0.656	0.656
sdrD	Proteína con repeticiones de serina-aspartato	0.538	0.538

No se reportó interacción de tipo Genes cercanos, Genes fusionados, Proteínas homologas, Co-expresión, Relación experimental o Base de datos en ninguna de las redes de interacción y para la red de interacción de la proteína CP40r 2J-L tampoco se identificó relación entre las proteínas debido a la mención en textos científicos.

La interface digital IEDB permitió la predicción de 16 epítomos de la proteína PLDr con potencial para activar células T CD8⁺ en el contexto del MHC-I (Cuadro 7). Los fragmentos presentados por más de un tipo de alelo del MHC-I fueron: posición 56 VAIGANAL 63 (alelos H-2-Kb y H-2-Db), 139 LEPAGVRV 146 (alelos H-2-Kd, H-2-KK y H-2-Qa1) y secuencia 202 GYYNI 206 (alelos H-2-Kd, H-2 Kb y H-2-KK).

Cuadro 7. Epítomos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para la activación de Linfocitos T en el contexto del MHC clase I.

Proteínas	No	Alelo	Inicio	Fin	Epítomos	Score
PLDr 2J-L	1	H-2-Kb	146	154	VLYGFYKTV	0.916
	2	H-2-Kk	279	286	TENSFKAI	0.87
	3	H-2-Kb	104	111	ANITFTWL	0.822
	4	H-2-Kk	89	96	AEEIFKHI	0.791
	5	H-2-Kd	39	47	VYAIAHRVL	0.77
	6	H-2-Db	56	65	VAIGANALEI	0.715
	7	H-2-Kk	139	147	LEPAGVRVL	0.715
	8	H-2-Kd	202	210	GYYNINQGF	0.628
	9	H-2-Kb	4	11	KVVLFLSI	0.62
	10	H-2-Kd	137	146	KYLEPAGVRV	0.609
	11	H-2-Kb	199	206	ADYGYNYI	0.553
	12	H-2-Kk	139	146	LEPAGVRV	0.545
	13	H-2-Kk	63	70	LEIDFTAW	0.526
	14	H-2-Kb	56	63	VAIGANAL	0.524
	15	H-2-Kb	266	273	FGFKITHF	0.522
	16	H-2-Qa1	138	146	YLEPAGVRV	0.516
CP40r 2J-L	1	H-2-Kk	173	181	NEYVVKHNL	0.943
	2	H-2-Kk	294	302	EENDTNRFL	0.927
	3	H-2-Kk	158	167	VEDDYKYREI	0.694
	4	H-2-Kb	205	213	KIMGAFSEL	0.672
	5	H-2-Qa1	137	145	RTVGAQLLL	0.664
	6	H-2-Kb	206	213	IMGAFSEL	0.654
	7	H-2-Kk	228	235	HEGYKYLI	0.651
	8	H-2-Qa1	333	341	ALDRDGRTY	0.645
	9	H-2-Kk	172	181	YNEYVVKHNL	0.61
	10	H-2-Kd	163	171	KYREIARDV	0.58
	11	H-2-Kk	294	301	EENDTNRF	0.568
	12	H-2-Qa1	205	213	KIMGAFSEL	0.539
	13	H-2-Kb	339	349	RTYDGDDFTTL	0.53
	14	H-2-Kb	135	143	VVRTVGAQL	0.52
	15	H-2-Kb	17	25	TSALFASTF	0.502

Para la proteína CP40r 2J-L, las secuencias que fueron identificadas como epítomos reconocidos por más de un tipo de alelo fueron: secuencias 137 RTVGAQL 143 (alelos H-2-Qa1 y H-2-Kb) y 205 KIMGAFSEL 213 (alelos H-2- Kb y H-2-Qa1). En ninguna de las

proteínas se identificaron epítomos con la capacidad de ser presentados por los alelos H-2-Dd, H-2-Ld o H-2-Qa2 del MHC clase I (Cuadro 7).

Los epítomos de ambas proteínas con capacidad de ser presentados en el contexto del MHC-II para la activación de Linf T CD4⁺ se muestran en el Cuadro 8. Se identificaron 10 epítomos en la proteína PLDr y 13 en CP40r, mientras que ninguna de las dos proteínas presentó epítomos para la activación de células Linf T en el contexto del alelo H2-Ied.

Cuadro 8. Epítomos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para la activación de Linfocitos T en el contexto del MHC clase II.

Proteínas	No	Alelo	Inicio	Fin	Epítomos	Score
PLDr 2J-L	1	H-2-IAb	24	38	AAPVVHNPASTANRP	0.6864
	2	H-2-IAb	25	39	APVVHNPASTANRPV	0.6886
	3	H-2-IAb	20	34	GNAAAAPVVHNPAST	0.662
	4	H-2-IAb	271	285	THFYRHADTENSFKA	0.6544
	5	H-2-IAb	19	33	VGNAAAAPVVHNPAS	0.6458
	6	H-2-IAb	270	284	ITHFYRHADTENSFK	0.6179
	7	H-2-IAb	18	32	PVGNAAAAAPVVHNPA	0.546
	8	H-2-IAb	23	37	AAAPVVHNPASTANR	0.5471
	9	H-2-IAd	167	181	RDGEAVALSGPAQDV	0.6131
	10	H-2-IAd	166	180	LRDGEAVALSGPAQD	0.5894
CP40r 2J-L	1	H-2-IAb	210	224	FSELMGPKAPANEGK	0.7198
	2	H-2-IAb	209	223	AFSELMGPKAPANEG	0.6642
	3	H-2-IAb	208	222	GAFSELMGPKAPANE	0.5786
	4	H-2-IAb	286	300	FMAGYAHPEENDTNR	0.5793
	5	H-2-IAb	211	225	SELMGPKAPANEGKK	0.5847
	6	H-2-IAb	283	297	SCQFMAGYAHPEEND	0.5853
	7	H-2-IAb	287	301	MAGYAHPEENDTNR	0.5647
	8	H-2-IAd	243	257	QTSQVGLVADLVDYV	0.6316
	9	H-2-IAd	242	256	AQTSQVGLVADLVDY	0.6365
	10	H-2-IAb	285	299	QFMAGYAHPEENDTN	0.5379
	11	H-2-IAd	265	279	DTKESVTQVWNGFRD	0.612
	12	H-2-IAb	285	299	QFMAGYAHPEENDTN	0.5379
	13	H-2-IAd	265	279	DTKESVTQVWNGFRD	0.612

VIII.1.3 Simulación de la respuesta inmune humoral y celular ante la aplicación de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como formulados vacunales.

La predicción de la respuesta inmune humoral y celular inducida por la vacuna de subunidades PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se realizó *in silico* con el programa C-ImmSim de

simulación inmune dinámica. El programa identificó posibles epítomos/péptidos activadores de la respuesta inmune humoral (Cuadro 9) y celular (Cuadro 10).

Cuadro 9. Epítomos de Linfocitos B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, para la simulación de la respuesta inmune humoral mediante el programa C-ImmSim.

Proteína	Número	Posición	Longitud	Epítomos LinF B
PLDr 2J-L	1	31	4	ASTA
	2	84	4	AGAT
	3	116	5	DYCRD
	4	227	5	SEARD
	5	247	4	QDAR
	6	276	5	ADTEN
CP40r 2J-L	1	107	6	DNQKSD
	2	156	7	HVEDDYK
	3	218	12	PANEGKKPDHEG
	4	239	6	DNAQTS
	5	261	8	YKKDTKES
	6	292	6	PEENDT
	7	322	5	GGEKG
	8	335	10	RDGRTYDGDD
	9	364	8	TGESSTD
	10	375	4	TGSR

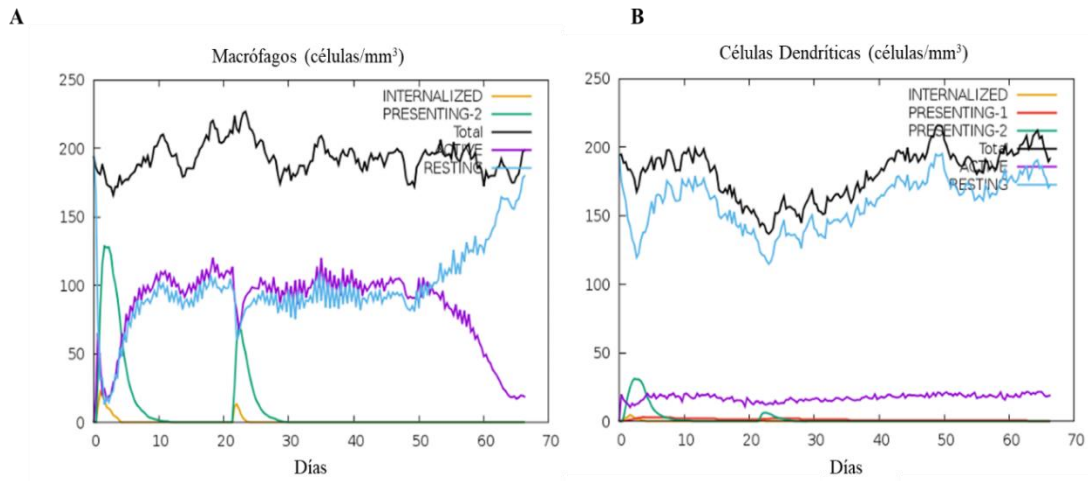


Figura 9. Simulación de la activación de células presentadoras de antígenos ante la inmunización con las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. **A:** Macrófagos. **B:** Células dendríticas. Leyenda: INTERNALIZED, internalización del antígeno.

PRESENTING-1, presentación de antígenos en el contexto MHC-I. PRESENTING-2, presentación de antígenos en el contexto del MHC-II. ACTIVE, activación de las células. RESTING, no activación de las células.

La predicción de la presentación de antígenos en el contexto del MHC-I y MHC-II se refleja en la Figura 9, con la activación de las poblaciones de Macrófagos y Células dendríticas (Figura 9). La actividad presentadora de antígenos de los macrófagos se indicó fundamentalmente por la acción de las moléculas MHC-II en los días 0-10 y 20-30 (Figura 9A). Para las células dendríticas también se indicó una mayor actividad en la presentación de antígenos en el contexto del MHC-II, siendo el intervalo correspondiente a la primera inmunización superior a la segunda aplicación (Figura 9B).

La simulación de la respuesta inmune humoral indicó que la activación de los Linf B se producirá entre los días 10-20 post 1ra inoculación seguido de un aumento entre los días 20-25 luego de la 2da inmunización. El simulador propone que se mantendrán activas las poblaciones de Linf B hasta 60 días post-inoculación (Figura 10A).

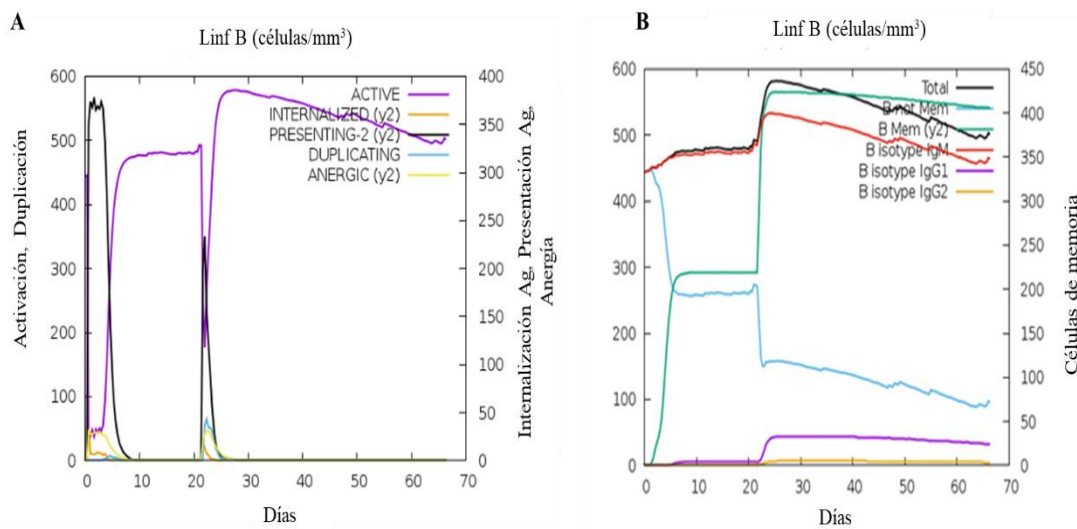


Figura 10. Simulación de la respuesta de Linfocitos B ante la inmunización con las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. **A:** Activación de LinF B, presentación de antígenos, duplicación y anergia. **B:** Producción de diferentes poblaciones de LinF B (IgM, IgG1, IgG2). La predicción se realizó simulando 2 inmunizaciones con las proteínas recombinantes PLDr y CP40r al día 0 y 21. Leyenda: INTERNALIZED, internalización del antígeno. PRESENTING-2, presentación de antígenos en el contexto del MHC-II. ACTIVE, activación de las células. DUPLICATING, duplicación. ANERGIC, anergia.

Las poblaciones totales de Linf B aumentarán aproximadamente a partir del día 7 post 1ra inoculación, alcanzando los valores superiores a partir de los 21 días y manteniéndose elevados hasta los 60 días de simulación del experimento. Los Linf B correspondientes a la producción de anticuerpos de isotipo IgG1 aumentarán a partir de los 21 días y se mantendrán superiores a los Linf B de producción de IgG2 (Figura 10B).

La simulación de la respuesta humoral mediada por las células plasmáticas (PLB) para la producción de inmunoglobulinas fue caracterizada por un aumento de las poblaciones productoras de IgM a partir del día 5 aproximadamente, seguido de un aumento a los 21 días tras la segunda inmunización. La respuesta de PLB para la producción de IgG1 fue superior a IgG2, las cuales se mantendrán hasta el día 40 del experimento (Figura 11A).

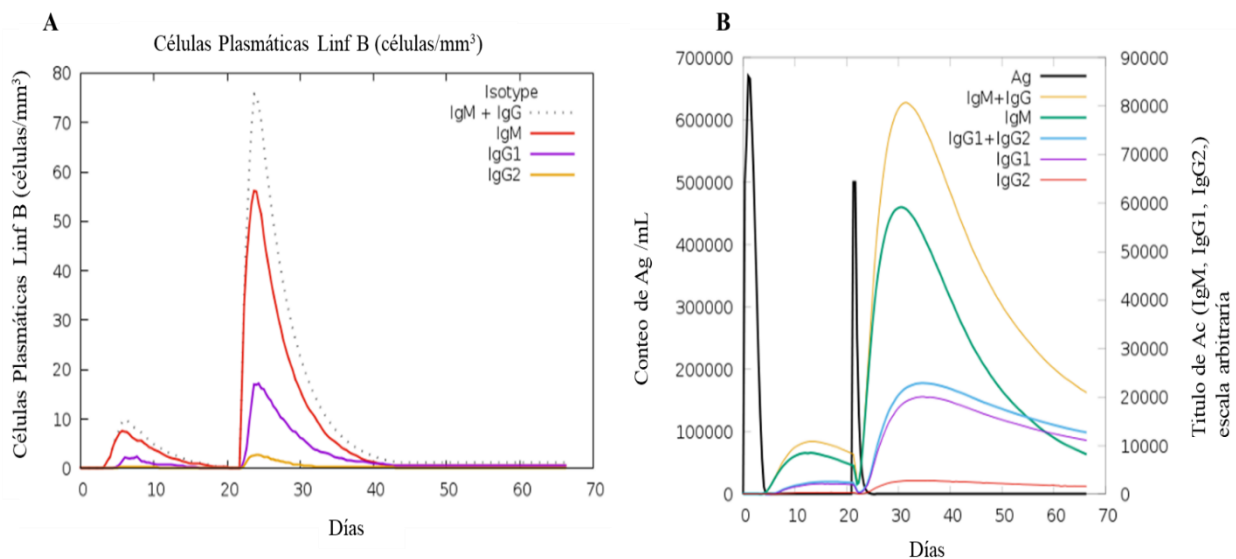


Figura 11. Predicción de la producción de inmunoglobulinas ante la inmunización con PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. **A:** Respuesta de células plasmáticas para la producción de las inmunoglobulinas IgM, IgG1, IgG2. **B:** Título de anticuerpos IgM, IgG1e IgG2.

El título de anticuerpos totales (IgM+IgG) alcanzó su pico máximo a los 30 días luego de la 2da inmunización. La producción de Ac IgG1 se estima será superior a los Ac IgG2 (Figura 11B). El programa estimó la activación de Linf T CD8⁺ y CD4⁺ teniendo en cuenta la presentación de antígenos (Cuadro 10) en el contexto del MHC-I y MHC-II, respectivamente. La Figura 10 evidencia la predicción del comportamiento de las poblaciones de Linf T como resultado de la aplicación de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L simulado en el programa C-ImmSim. El programa predijo que la población de células Th1 será predominante ante la respuesta de tipo Th2 (Figura. 12B).

Cuadro 10. Epítopos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para la activación de Linf T en el contexto de la presentación de antígenos por el MHC-I y MHC-II, para la simulación de la respuesta inmune celular por el programa C-ImmSim.

Proteína	No	Posición	Epítopos LinF T	MHC	Proteína	No	Posición	Epítopos LinF T	MHC
PLDr 2J-L	1	16	LPVGNAAAA	MHC-I	CP40r 2J-L	1	3	SPRSVSRLI	MHC-I
	2	31	ASTANRPVY	MHC-I		2	7	VSRLITVGI	MHC-II
	3	80	IPTSAGATA	MHC-I		3	20	FASTFSAVA	MHC-II
	4	109	WLDIKNPDY	MHC-I		4	24	FSAVASAES	MHC-II
	5	155	GPAWKTITA	MHC-I		5	27	VASAESATL	MHC-II
	6	7	FLSIIMAIM	MHC-II		6	119	FHREYQPEL	MHC-II
	7	8	LSIIMAIML	MHC-II		7	134	VVRTVGAQL	MHC-II
	8	12	MAIMLPVGN	MHC-II		8	135	VRTVGAQLL	MHC-II
	9	14	IMLPVGNAA	MHC-II		9	202	LRKIMGAFS	MHC-II
	10	15	MLPVGNAAA	MHC-II		10	205	IMGAFSELM	MHC-II
	11	18	VGNAAAPV	MHC-II		11	209	FSELMGPKA	MHC-II
	12	26	VVHNPASTA	MHC-II		12	212	LMGPKAPAN	MHC-II
	13	38	VYIAHRVL	MHC-II		13	238	FDNAQTSQV	MHC-II
	14	137	YLEPAGVRV	MHC-II		14	285	FMAGYAHPE	MHC-II
	15	149	FYKTVGGPA	MHC-II		15	300	FLTAVGEVN	MHC-II
	16	150	YKTVGGPAW	MHC-II		16	307	VNKSGAMQV	MHC-II
	17	158	WKTITADLR	MHC-II		17	318	WKPEGGEKG	MHC-II
	18	184	FARSENKIL	MHC-II		18	345	FTTLKPTDF	MHC-II
	19	241	WTIATGQDA	MHC-II		19	360	IELTTGESS	MHC-II
	20	273	YRHADTENS	MHC-II					

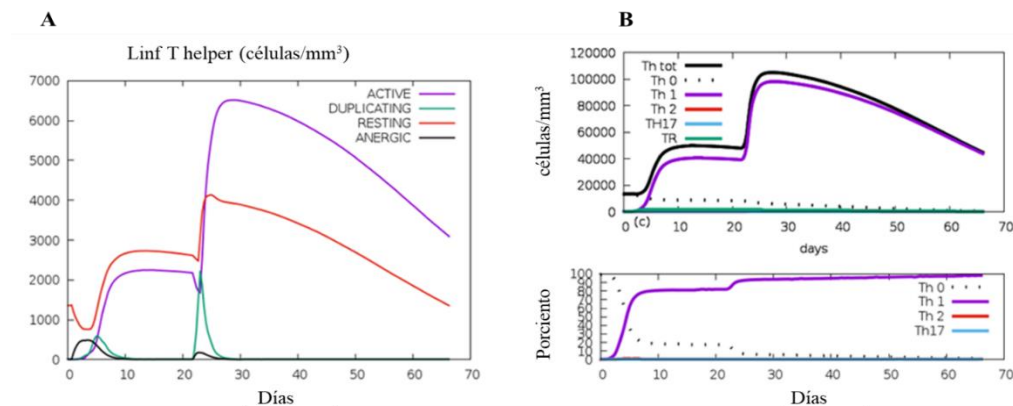


Figura 12. Simulación de la respuesta celular ante la inmunización con las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. **A:** Activación de Linf Th1/Th2, duplicación, no activos y anergia. **B:**

Conteo de células y porcentaje. Leyenda: ACTIVE, activación de las células. DUPLICATING, duplicación. RESTING, no activación de las células. ANERGIC, anergia.

Los Linf T citotóxicos (LTc) de memoria no mostraron activación y las células efectoras presentaron una disminución en los valores en la medida que avanza el experimento (Figura 13A). La activación de las células LTc se produce de forma progresiva con aumento significativo hasta los 60 días del experimento (Figura 13B).

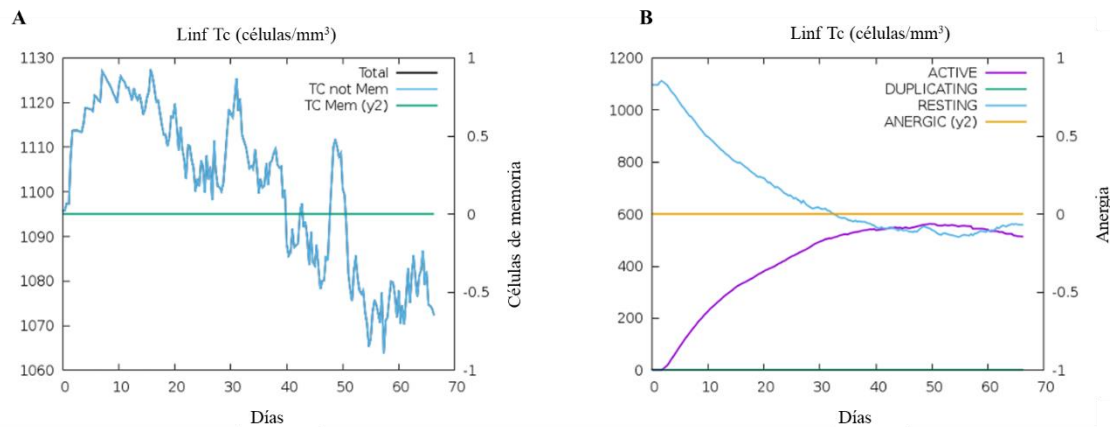


Figura 13. Simulación de la respuesta celular mediada por los Linf Tc ante la inmunización con las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. **A:** Linf Tc de memoria (TC Mem) y Linf Tc efectoras (TC not Mem). **B:** Representación de la activación y la no activación (RESTING) de las células Linf Tc.

También se estimó la producción de citoquinas, siendo los niveles de IL-2 e INF- γ superiores al resto de las moléculas analizadas (Figura 14).

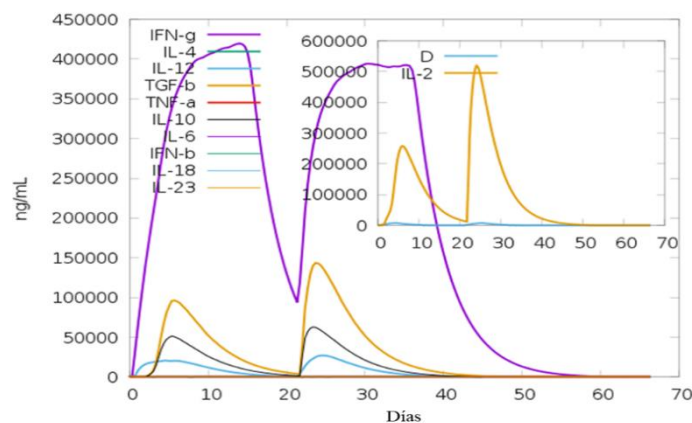


Figura 14. Simulación de la concentración de citoquinas ante la inmunización con las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

La gráfica muestra dos picos de respuestas que alcanzan los valores máximos entre los 10 días luego de la primera inmunización y posteriormente entre los días 30-40 tras la segunda inmunización.

VIII. 2 Determinación de la dosis letal de la vacuna de subunidades recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L en el modelo murino.

VIII.2.1 Obtención de las proteínas recombinantes PLDr y CP40 derivadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L.

Las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se obtuvieron en el sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) trasformada con los plásmidos pET28a-*pld* y pET28a-*cp40*. Ambas proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad mediada por el marcador de Histidinas presente en las proteínas recombinantes. La Figura 13 muestra el análisis de las fracciones derivadas de la purificación identificadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS- PAGE al 15 %. La electroforesis mostró dos bandas reforzadas, con patrones de peso molecular según la talla esperada de aproximadamente de 42 KDa para CP40r (Figura 15A) y de 30 KDa para PLDr (Figura 15B).

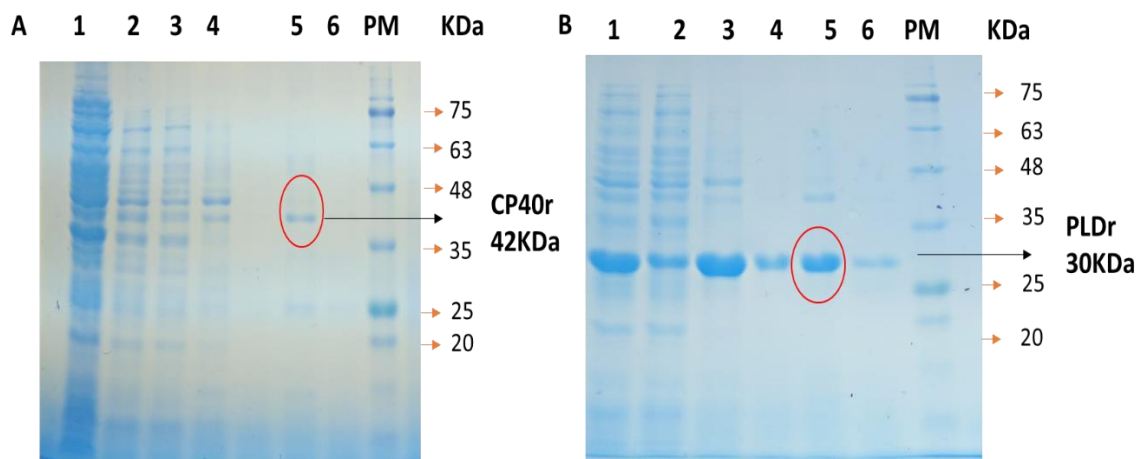


Figura 15. Análisis de las fracciones de purificación de las proteínas recombinantes. **A:** CP40r y **B:** PLDr mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Carril 1: Proteínas Totales de la fermentación **A:** *E. coli* BL21 (DE3) - pET28a-*cp40*, **B:** *E. coli* BL21 (DE3) - pET28a-*pld*. Carril 2: Lisis de los cultivos bacterianos. Carril 3: Pase a través de la columna. Carril 4: Lavado. Carril 5: Elusión 1. Carril 6: Elusión 2. En el carril 5 se evidencian las bandas correspondientes con el peso molecular esperado para las proteínas recombinantes, en ambos casos se señalan con un círculo rojo. PM: Patrón de peso molecular, Bluestain 2 Protein Ladder, Goldbio (5-245KDa).

La concentración de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L presente en cada fracción de la purificación se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Cuantificación de las proteínas de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L presente en las diferentes fracciones de la purificación.

Viales		Concentración (µg/mL)	Valores de DO (562nm)
Curva Patrón	A	2,000	2.5055
	B	1,500	2.005
	C	1000	1.386
	D	750	1.0675
	E	500	0.745
	F	250	0.4665
	G	125	0.2905
	H	25	0.1295
	I	0	0.1035
Muestras	Lavado 1 (W1) PLDr	976.75	1.324
	Lavado 1 (W2) PLDr	249.04	0.4375
	Elusión 1 (E1) PLDr	426.76	0.654
	Elusión 2 (E2) PLDr	114.41	0.2735
	Elusión 1 (E1) CP40r	113.59	0.2725

VIII.2.2 Formulación de la vacuna de subunidades PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

Para la evaluación de la dosis letal de la vacuna y el estudio de la respuesta inmune se desarrollaron formulados vacunales que incluyeron las proteínas recombinantes por separado o combinadas, siendo todos los preparados sometidos a prueba de esterilidad, donde se observó la no formación de colonias en placas de agar sangre. Las proteínas que fueron inactivadas por choque térmico mostraron la formación de precipitados de color blanco.

VII.2.3 Determinación de la dosis letal de la vacuna de subunidades PLDr 2J-L y CP40r 2J-L en el modelo murino.

En los grupos experimentales donde se utilizó la proteína PLDr 2J-L (50µg) sin inactivar + Saponina (7.5µg) o combinada con CP40r 2J-L (50µg) la letalidad registrada fue de 9 animales de un total de 10, con efectos tóxicos locales y sistémicos: formación de fistula y

pérdida de pelo (Figura 16A), formación de absceso en el sitio de inoculación (Figura 16B), aumento de tamaño en el bazo, absceso en el sitio de inoculación.



Figura 16. Lesiones provocadas por el efecto tóxico de las formulaciones con la proteína PLDr 2J-L sin inactivar. **A:** Fistulas y pérdida de pelo. **B:** Formación de abscesos en el sitio de inoculación.

Para el grupo CP40r 2J-L (50µg) + Saponina (7.5µg) se observaron 4 muertos/ 10 y en los grupos controles PBS 0/10 y PBS + Saponina (7.5µg) 3 muertos / 10. Los valores de DL_{50} y DL_{100} se determinaron mediante análisis de regresión entre las dosis establecidas (proteínas sin inactivar) y el porcentaje de letalidad. El cálculo para PLDr 2J-L indicó una DL_{50} de 36.11µg y DL_{100} de 60.8µg, para CP40r 2J-L los valores fueron 67.04µg y 122.7µg respectivamente.

Las evaluaciones con las proteínas recombinantes inactivadas PLDr 2J-L 25µg o 50µg, CP40r 2J-L 25µg o 50µg, y Saponina 3.5µg no mostraron letalidad en los grupos experimentales. Teniendo en cuenta estos resultados las proteínas recombinantes inactivadas se utilizaron con valores de 50µg por dosis para el estudio de la respuesta inmune humoral y celular en el modelo murino.

VIII. 3 Evaluación *in vivo* de la respuesta inmune humoral y celular de la vacuna de subunidades recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L en ratones BALB/c.

VIII.3.1 Reactivación de la virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 utilizada para el desafío de los animales vacunados.

Los animales del grupo experimental desafiado con 10^6 UFC/mL de la cepa ATCC 43926 murieron antes de los 10 días sin evidencias de abscesos y con hemorragias sistémicas. Por otra parte los animales del grupo desafiado con 10^4 UFC/mL fueron sacrificados a los 15 días para la evaluación del desarrollo de lesiones características de la Linfadenitis caseosa como: abscesos en el sitio de inoculación y en órganos internos. En dos de los animales se observó

la formación de un absceso en el sitio de inoculación (Figura 17A) y no fueron evidentes abscesos en órganos. El cultivo en agar sangre de las muestras colectadas de las lesiones permitió el aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cuya identificación fue confirmada mediante PCR Cuádruplex para la amplificación de segmentos específicos de los genes: ARNr 16S, *rpoB*, *pld* y *narG* (Figura 17 B-C).

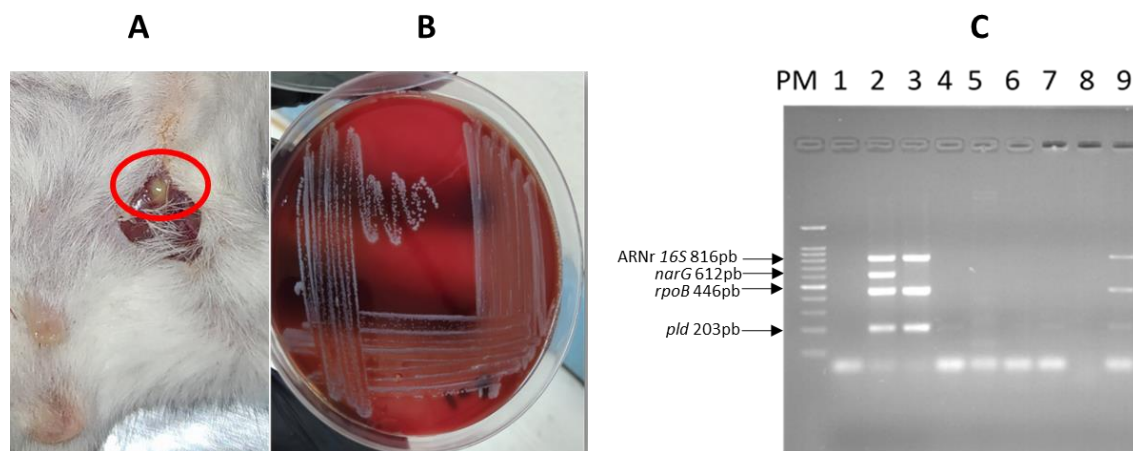


Figura 17. Identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislado de absceso del sitio de inoculación de animales del grupo experimental desafiado con 10^4 UFC/mL. **A:** Absceso formado en el sitio de inoculación. **B:** Cultivo en agar sangre de la muestra tomada del absceso. **C:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la resolución de muestras del PCR Cuádruplex. **PM:** Patrón de peso molecular de 100pb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen, USA). **Carril 1:** Control negativo. **Carril 2:** Control *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi. **Carril 3:** Control *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis. **Carril 4-7:** identificación de muestras de ADN de aislado bacterianos del bazo, hígado, pulmón y riñón. **Carril 9:** Bandas características de los genes amplificados para la identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, a partir del ADN del aislado bacteriano obtenido del absceso del sitio de inoculación.

VIII.3.2 Hallazgos clínico-patológicos en animales vacunados

Los animales vacunados no mostraron reacciones adversas en el sitio de inoculación como pérdida de pelo, fistulas o formación de abscesos. Durante el proceso de vacunación no se reportaron muertes en ninguno de los grupos experimentales. Siguiendo el esquema de toma de muestra establecido en el diseño experimental se realizaron evaluaciones histopatológicas de diferentes órganos de los animales vacunados y el grupo control.

Luego de 21 días de concluido el esquema de vacunación en las muestras de piel del sitio de inoculación se observó infiltración de células mononucleares en dermis excepto en los grupos G1 y G2 (Figura 18A). En las muestras de bazo de los animales de los grupos experimentales se evidenció hiperplasia del tejido linfóide a diferencia de los animales del grupo control no

vacunado (Figura 18B). En las muestras analizadas de Pulmón, Hígado, Corazón y Riñones no se observaron cambios patológicos aparentes.

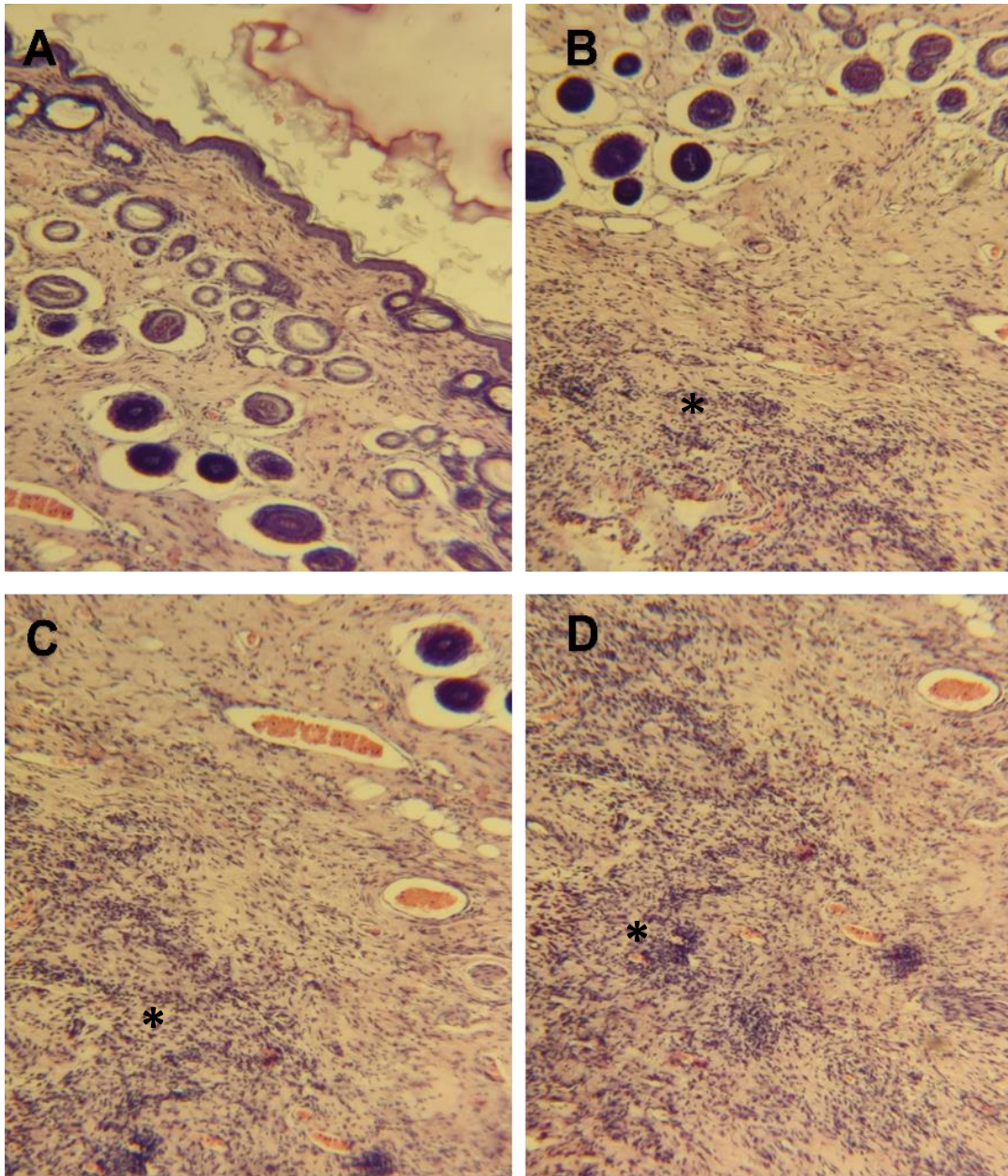


Figura 18A. Piel del sitio de inoculación vía subcutánea de ratones de los grupos experimentales a los 21 días de concluido el esquema de vacunación, teñidos con Hematoxilina y Eosina. **A:** Grupo G1: Control (PBS). Sin cambios patológicos aparentes en piel (10X). **B, C y D:** Grupo G3: PLDr+CP40r, Grupo G4: PLDr y Grupo G5: CP40r, Moderado a severo infiltrado mononuclear (asterisco) en dermis constituyendo focos y

distribución intersticial dispersa; necrosis discreta de tejido adiposo y proliferación de tejido conectivo (10X).

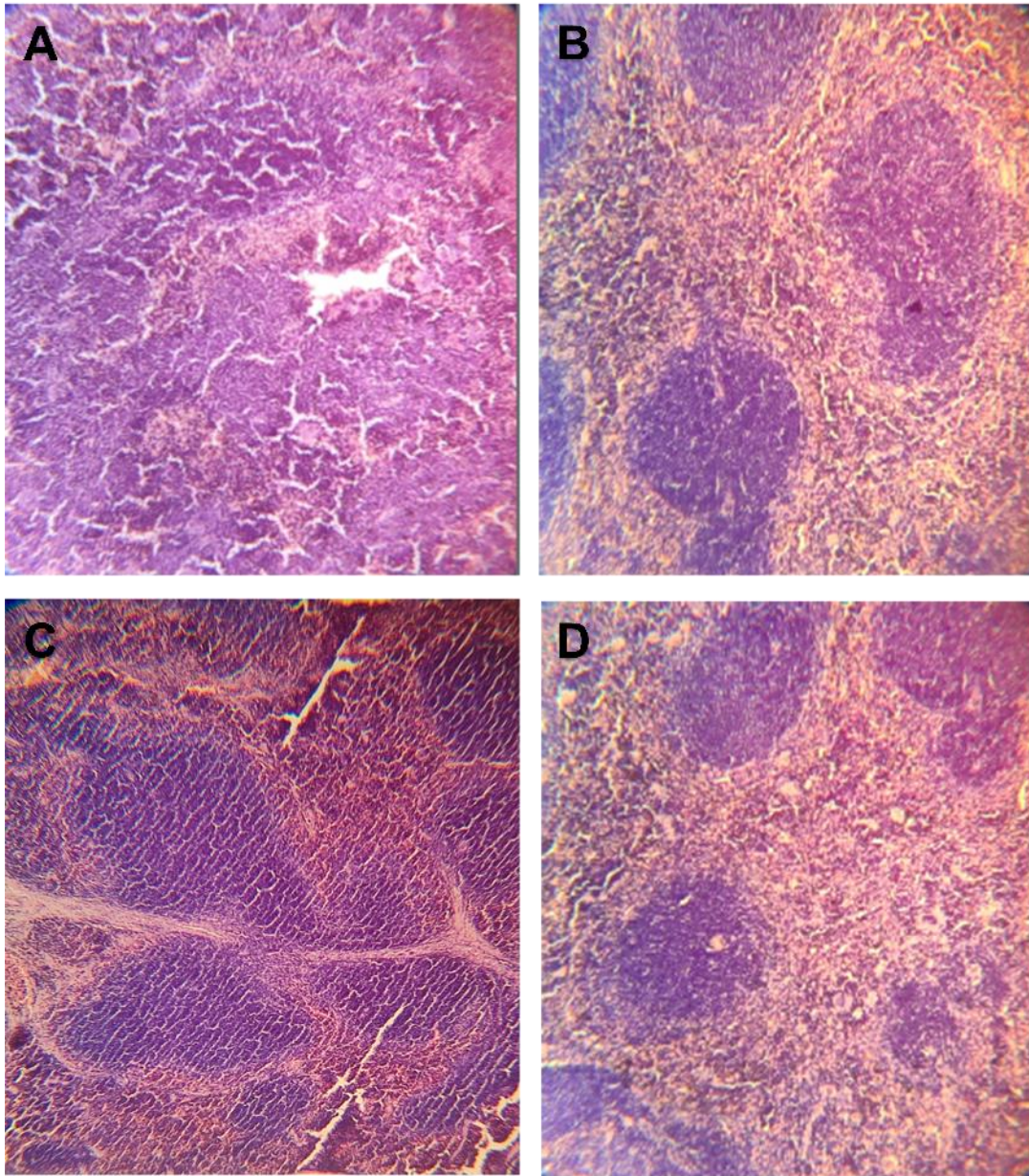


Figura 18B. Análisis histopatológico de muestras de tejido esplénico de animales de los grupos experimentales a los 21 días de concluido el esquema de vacunación. **A:** Grupo G1: Control (PBS). Sin cambios patológicos aparentes en bazo (10X). **B:** Grupo G2: Control adyuvante (Saponina). Hiperplasia leve difusa del tejido linfoide de los folículos (10X). **C:** Grupo G3: PLDr+CP40r. Hiperplasia linfoide severa difusa de los folículos (10X). **D:**

Representación de los Grupos G4 (PLDr) y G5 (CP40r). Hiperplasia leve difusa del tejido linfoide de los folículos (10X).

VIII.3.3 Porcentaje de Supervivencia y hallazgos clínico-patológicos en animales desafiados.

Luego del Desafío de un total de 20 animales analizados por cada grupo se reportó un 100% de letalidad en los animales de los grupos controles G2 (Saponina) y G6 (Desafiados no vacunados), mientras que en los grupos vacunados se reportaron diferentes porcentajes de supervivencia (Cuadro 12). El grupo vacunado con la formulación en base a PLDr 2J-L+CP40r 2J-L (Grupo 3) mostró un 75% de supervivencia seguido del Grupo 4 y 5 con 70% y 65% (Figura 19).

El porcentaje de supervivencia indica el nivel de protección de las formulaciones PLDr 2J-L, CP40r 2J-L y la combinación de ambas proteínas, todas con adyuvante saponina, ante el desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926.

En los animales del grupo experimental control del desafío (G6) se evidenciaron lesiones características de la LAC como la formación de abscesos en el sitio de inoculación de la cepa de desafío y en órganos (Figura 20).

Cuadro 12. Porcentaje de supervivencia de animales inmunizados con diferentes formulaciones vacunales y desafiados con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 (10^4 UFC/mL).

Grupos	Formación de abscesos	Muertes post Desafío				Animales afectados	Porcentaje de Supervivencia
		7 días	15 días	21 días	30 días		
G1 (Control sano)	0	0	0	0	0	0	100%
G2 (Saponina)	Bazo (n=1) Hígado (n=1) Riñón (n=1) SID (n=1)	4	4	12	0	20/20	0%
G3 (PLDr+CP40r)	Riñón (n=1) SID (n=1)	1	3	1	0	5/15	75%
G4 (PLDr)	0	4	2	0	0	6/14	70%
G5(CP40r)	Riñón (n=1)	2	4	1	0	7 / 13	65%
G6 (Desafiado)	Bazo (n=1) Hígado (n= 2) Riñón (n= 2) SID (n= 4)	4	10	5	1	20/20	0%

Los grupos presentaron un total de 20 animales y (n) indica la cantidad de animales identificados con abscesos. SID: Sitio de inoculación de la cepa de desafío

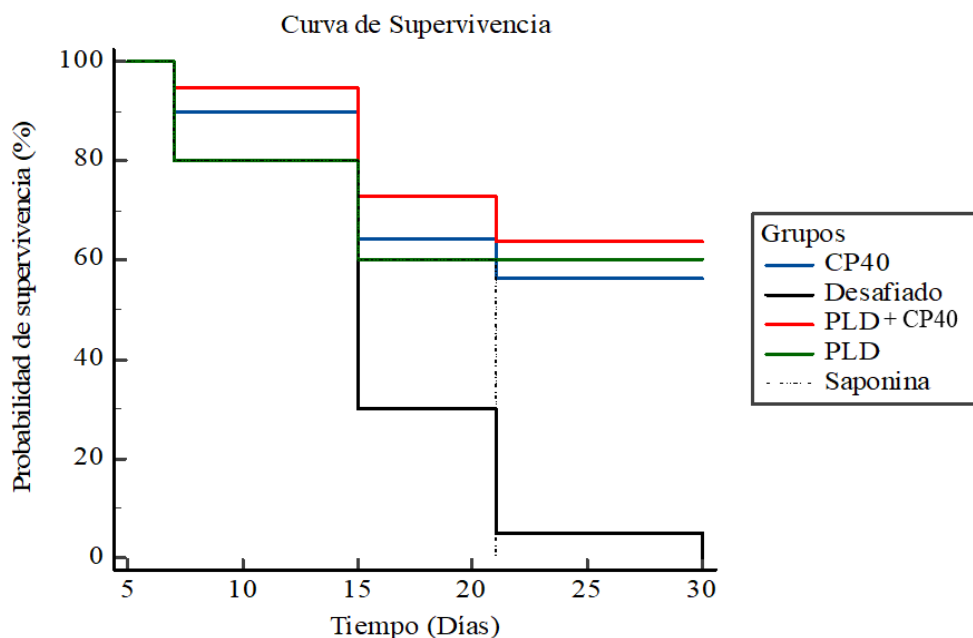


Figura 19. Cronología de la probabilidad de supervivencia (%) analizada a partir de 20 ratones de cada grupo experimental desafiados con *C. pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 (10^4 UFC/mL), con un intervalo de 21 días entre cada inmunización y el desafío. El análisis se realizó por el método de Kaplan-Meier con el programa Medcalc versión (22.007).

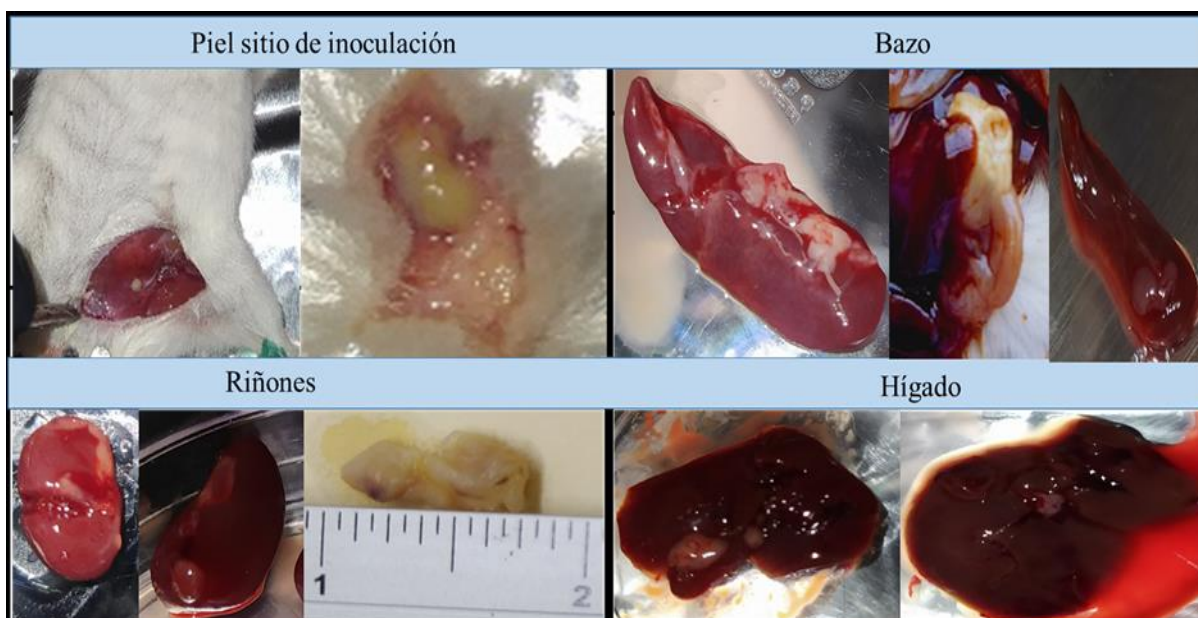


Figura 20. Formación de abscesos en órganos de animales del grupo experimental control del desafío (G6).

El análisis histopatológico de muestras de órganos de animales del grupo control del desafío (G6) permitió identificar a nivel celular lesiones características de la LAC (Cuadro 13, Figura 21.3-10).

Cuadro 13. Hallazgos histopatológicos en animales del grupo experimental control del desafío (G6).

Fig 21	Órganos	15 días	21 días	30 días
1	Piel sitio desafío	Zona de necrosis en dermis que se extiende a tejido subcutáneo, panículo carnoso y adiposo. Dermatitis supurativa con formación de microgranulomas e infiltrado no supurativo disperso.	Absceso sitio de inoculación. Centro de necrosis focal, rodeado de tejido conectivo e infiltración de células redondas, donde prevalecen los monocitos, linfocitos y células plasmáticas. En la periferia congestión de moderada a severa y hemorragias. Formación de abscesos.	Zona de necrosis en dermis que se extiende a tejido subcutáneo, panículo carnoso y adiposo. Se acompaña de infiltrado inflamatorio no supurativo disperso y en pequeños focos.
2	Bazo	Hiperplasia linfoide moderada difusa periarterial. Congestión severa difusa.	Hiperplasia linfoide severa difusa.	Hiperplasia de tejido linfoide de moderada a severa difusa.
3	Pulmones	Neumonía intersticial no supurativa.	Congestión y hemorragia, edema alveolar, infiltración perivascular mixta, neumonía intersticial supurativa y mononuclear multizonal.	Congestión y Hemorragia alveolar moderada, neumonía intersticial mixta zonal.
4	Riñones	Congestión renal moderada difusa, Nefritis no supurativa intersticial focal.	Nefritis intersticial multifocal granulomatosa, zona de amiloidosis renal. Tubulonefrosis proximal. Área de necrosis y exudado purulento piogranulomatoso.	Abscesos múltiples. Infiltrado piogranulomatoso difuso, con necrosis licuofactiva y coagulativa focal. Riñón: Nefritis intersticial granulomatosa
5	Hígado	Necrosis hepática multifocal piogranulomatosa	Múltiples focos de infiltración piogranulomatosa	Focos escasos y pequeños de infiltrado mononuclear
6	Corazón	Miocarditis y valvulitis supurativa crónica. Se acompaña de necrosis y congestión moderada, pericarditis.	Necrosis zonal acompañado de exudado piogranulomatoso, presencia de abundantes trombos bacterianos.	Miocarditis mixta multifocal discreta

Se realizó un análisis histopatológicos con muestras de órganos de animales de cada grupo experimental que sobrevivieron los 30 días post desafío con la cepa virulenta *C. pseudotuberculosis* ATCC 43926 (Cuadro 14).

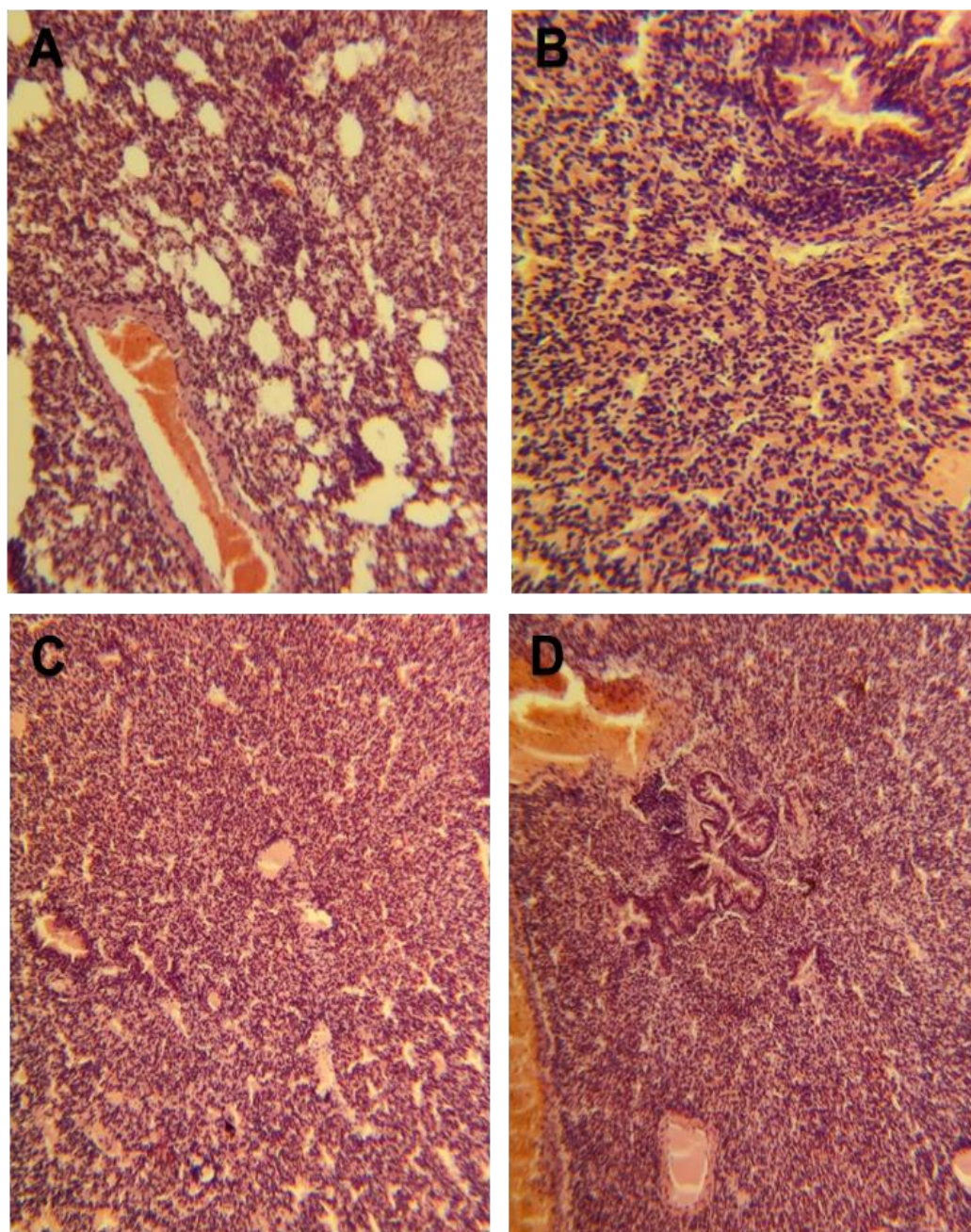


Figura 21.3 Pulmón de ratones del Grupo G6 control del desafío, tinción Hematoxilina y Eosina. **A:** 15 días post desafío, Neumonía intersticial no supurativa moderada (10X). **B-D:** 21 días post desafío, Neumonía no supurativa severa difusa (10X).

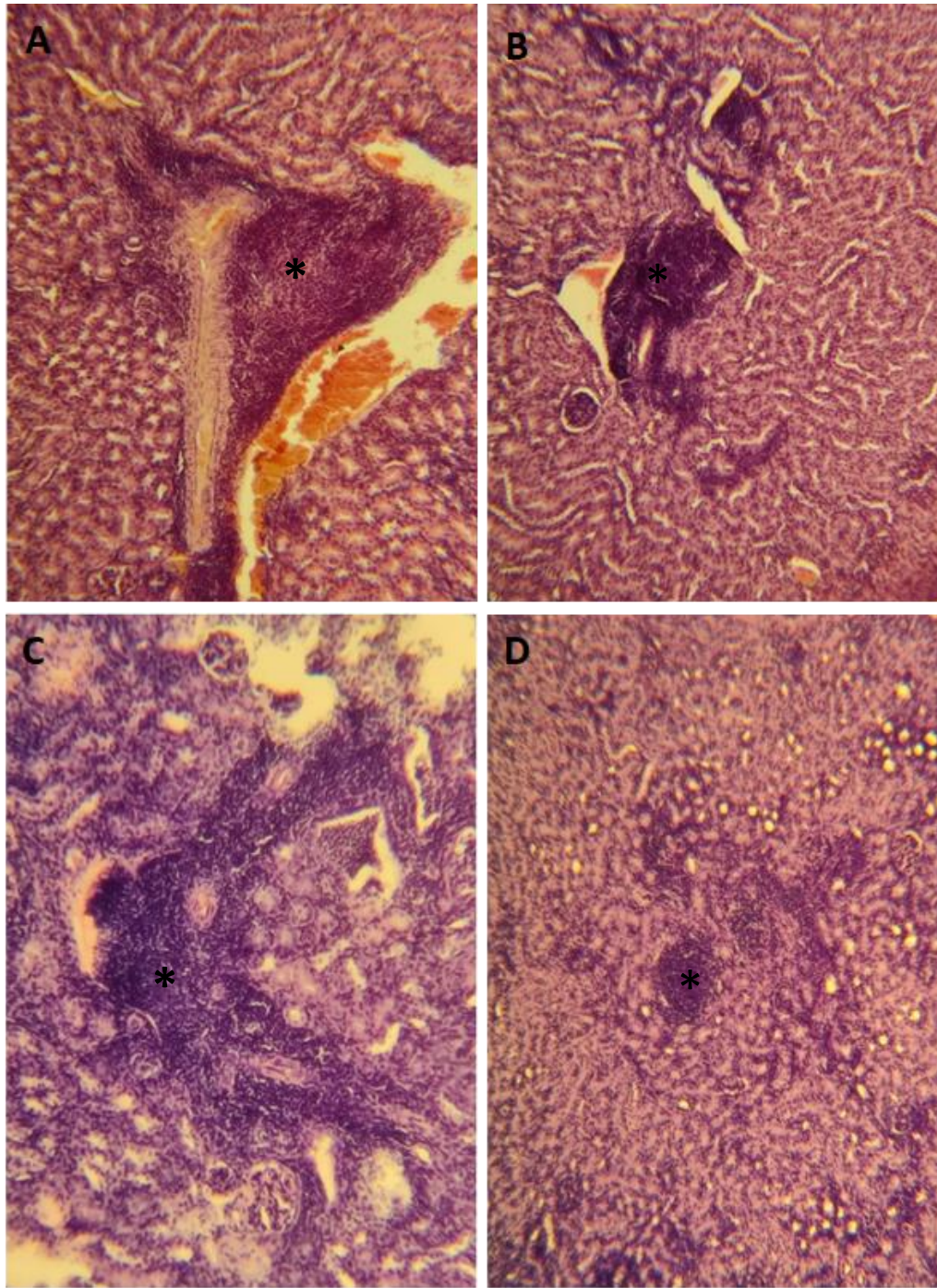


Figura 21.4. Riñón de ratones del Grupo G6 control del desafío, tinción Hematoxilina y Eosina. **A-D:** 21 días post desafío, Focos de infiltración no supurativa intersticial (asterisco) (40X).

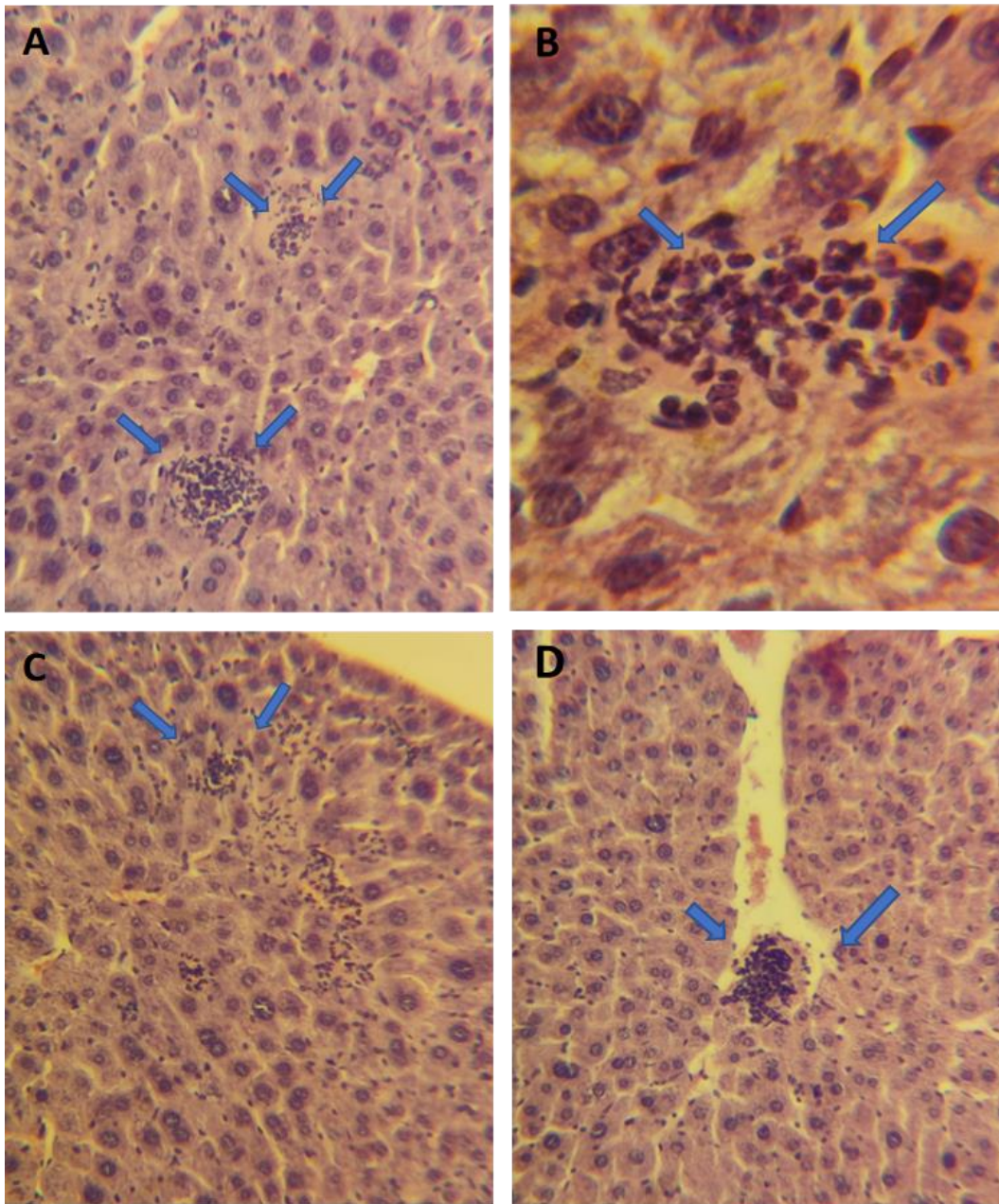


Figura 21.5. Hígado de ratones del Grupo G6 control del desafío, tinción Hematoxilina y Eosina. **A-B:** 15 días post desafío, **A:** Necrosis hepática multifocal piogranulomatosa (Flechas) (10X), **B:** Detalle de microgranuloma (Flechas) (40X). **C-D:** 30 días post desafío, **C:** Pequeños piogranulomas (Flechas), inflamación no supurativa y detritus dispersos (10X). **D:** Escasos piogranulomas (Flechas) (10X).

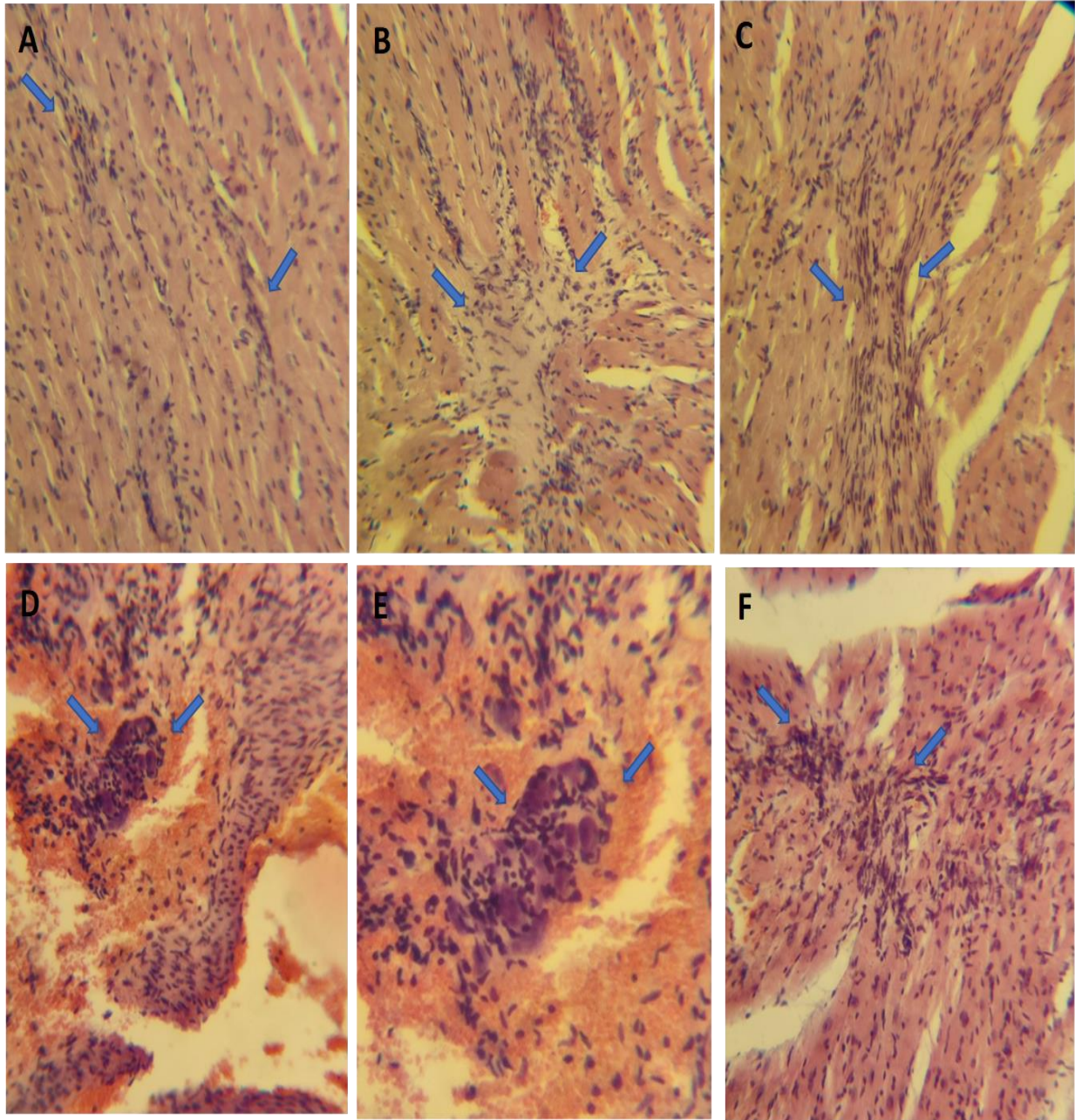


Figura 21.6. Corazón de ratones del Grupo G6 control del desafío, tinción Hematoxilina y Eosina. **A:** 15 días post desafío, Miocarditis no supurativa intersticial leve (Flecha). **B – E:** 21 días post desafío, **B:** Foco de necrosis (Flecha) e infiltración no supurativa intersticial moderada, **C:** Zona de necrosis (Flecha) con proliferación de tejido conectivo e infiltración no supurativa, **D (10X) y E (40X):** Presencia de émbolos bacterianos (flechas) asociado a áreas de necrosis e infiltrado inflamatorio mixto acompañado de zonas de hemorragia. Tinción Hematoxilina y Eosina (A 10X y B 40X).

Cuadro 14. Análisis histopatológico de muestras de órganos de animales vacunados 30 días post desafío con *C. pseudotuberculosis* cepa ATCC 43926 (10^4 UFC/mL).

Grupos	Bazo	Corazón	Hígado	Pulmones	Riñones	Piel (Sitio Desafío)
*G2 (Saponina)	Hiperplasia de tejido linfoide (n=3)	Miocarditis (n=3) no supurativa discreta multifocal (n=1), zona de necrosis con proliferación de tejido conectivo y hemorragia focal (n=2)	Necrosis y microgranulomas (n=1) foco de infiltración de células mononucleares (n=1) SCPA(n=2)	Neumonía intersticial crónica severa zonal (n=1), Congestión(n=2) hemorragia(n=1) Edema pulmonar moderado difuso (n=1)	Nefritis intersticial crónica perivascular de leve a moderada (n=2)	Ligero infiltrado mononuclear en dermis (n=2) SCPA(n=1)
G3 (PLDr+CP40r)	Hiperplasia de tejido linfoide severa difusa (n=3)	Infiltrado mononuclear intersticial (n=1) SCPA(n=2)	Necrosis endotelial multifocal leve con infiltración focal de células mononucleares y escasos PMNs (n=1). Escasos microgranulomas (n=1). SCPA(n=1)	Hiperplasia linfoide (n=1). SCPA (n=2)	Hiperplasia linfoide perivascular de leve a moderada (n=1). SCPA(n=2)	Escaso infiltrado mononuclear en tejido subcutáneo (n=1). Necrosis leve de grasa y musculo (n=1). Necrosis cutánea, foco de infiltración de mononucleares en dermis (n=1)
G4 (PLDr)	Hiperplasia de tejido linfoide severa difusa (n=3)	Miocarditis focal discreta (n=1) Miocarditis intersticial multifocal, infiltrado de mononucleares discretos (n=1) SCPA (n=1)	Escasos focos de infiltrado mononuclear (n=2) SCPA (n=1)	Congestión pulmonar moderada difusa (n=2). Hiperplasia linfoide (n=2) peribronquial y perivascular leve / moderada (n=1).	Hiperplasia linfoide perivascular (n=1) SCPA (n=2)	Necrosis focal en tejido graso y tejido subcutáneo (n=2), con algunas células PMN (n=1)
G5(CP40r)	Hiperplasia de tejido linfoide moderada (n=1) / severa (n=2) difusa	Miocarditis intersticial no supurativa zonal y multifocal leve (n=1). SCPA (n=2)	Microgranulomas pequeños (n=1) Escasos granulomas pequeños (n=1) SCPA (n=1)	Congestión y edema pulmonar moderado difuso e hiperplasia de tejido linfoide peribronquial y perivascular, hemorragia zonal bronquial y alveolar (n=2) SCPA (n=1)	SCPA (n=2)	Necrosis discreta zonal de tejido graso e infiltración de tejido subcutáneo (n=2).

*Los animales se evaluaron a los 21 días post desafío, (n) cantidad de animales identificados con la característica histopatológica.

La inspección visual indicó que no se formaron a nivel macroscópico abscesos en el sitio de inoculación o en los órganos analizados de los animales vacunados que sobrevivieron el desafío.

VIII.3.4 Curva ROC para establecer el valor de corte de la prueba ELISA anti-PLDr, anti-CP40r y anti PLDr+CP40r.

El análisis de la curva ROC para el ELISA con PLDr 2J-L (2.5µg) indicó un valor de corte de DO= 0.074 con AUC = 0.967 para una sensibilidad de 89.3% y una especificidad del 100%, mientras que para PLDr 2J-L (3.5µg) se obtuvieron los mejores indicadores con un área bajo la curva ROC de AUC = 0.975, un valor de corte de DO= 0.0835, para una sensibilidad de 91.7% y una especificidad del 100% (Figura 22).

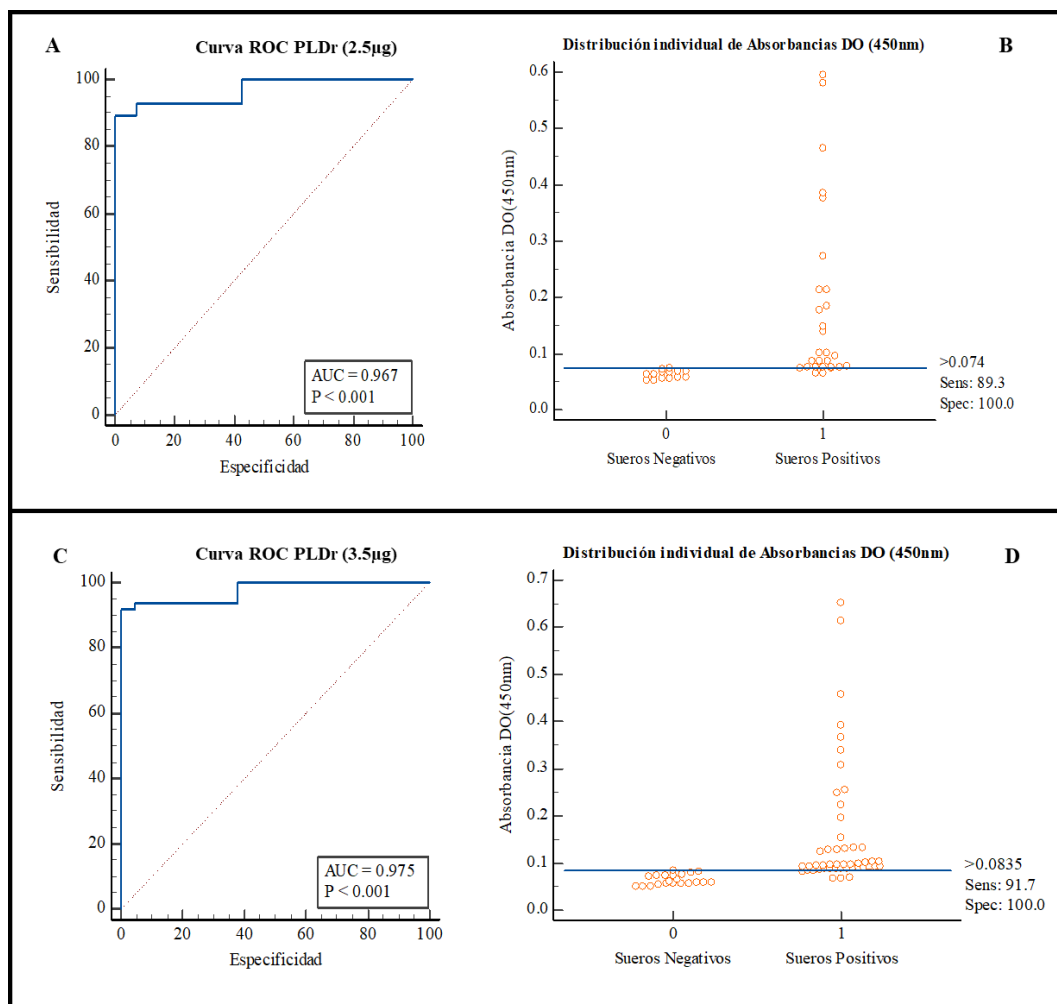


Figura 22. Curva ROC y distribución individual de absorbancias para establecer el valor de corte de la prueba ELISA anti-PLDr. Área bajo la curva (AUC) del ELISA indirecto utilizando como antígeno PLDr 2J-L (2.5µg) (A) y PLDr 2J-L (3.5µg) (C). Distribución individual de los resultados de absorbancia (DO) de las muestras de sueros de control

negativo y positivo (**B-D**). En la gráfica se indican los valores de sensibilidad y especificidad con (95% IC). La línea azul representa el valor de corte para cada ensayo ($p < 0.001$).

El análisis de la curva ROC para el ELISA indirecto usando CP40r 2J-L (2.5 μ g) mostró un valor de corte de 0.083 con AUC = 0.958 para una sensibilidad de 84.2% y una especificidad del 100%, mientras que con una concentración de 3.5 μ g el valor de corte fue de DO = 0.091 con AUC = 0.970 para una sensibilidad de 89.5% y una especificidad del 100% (Figura 23).

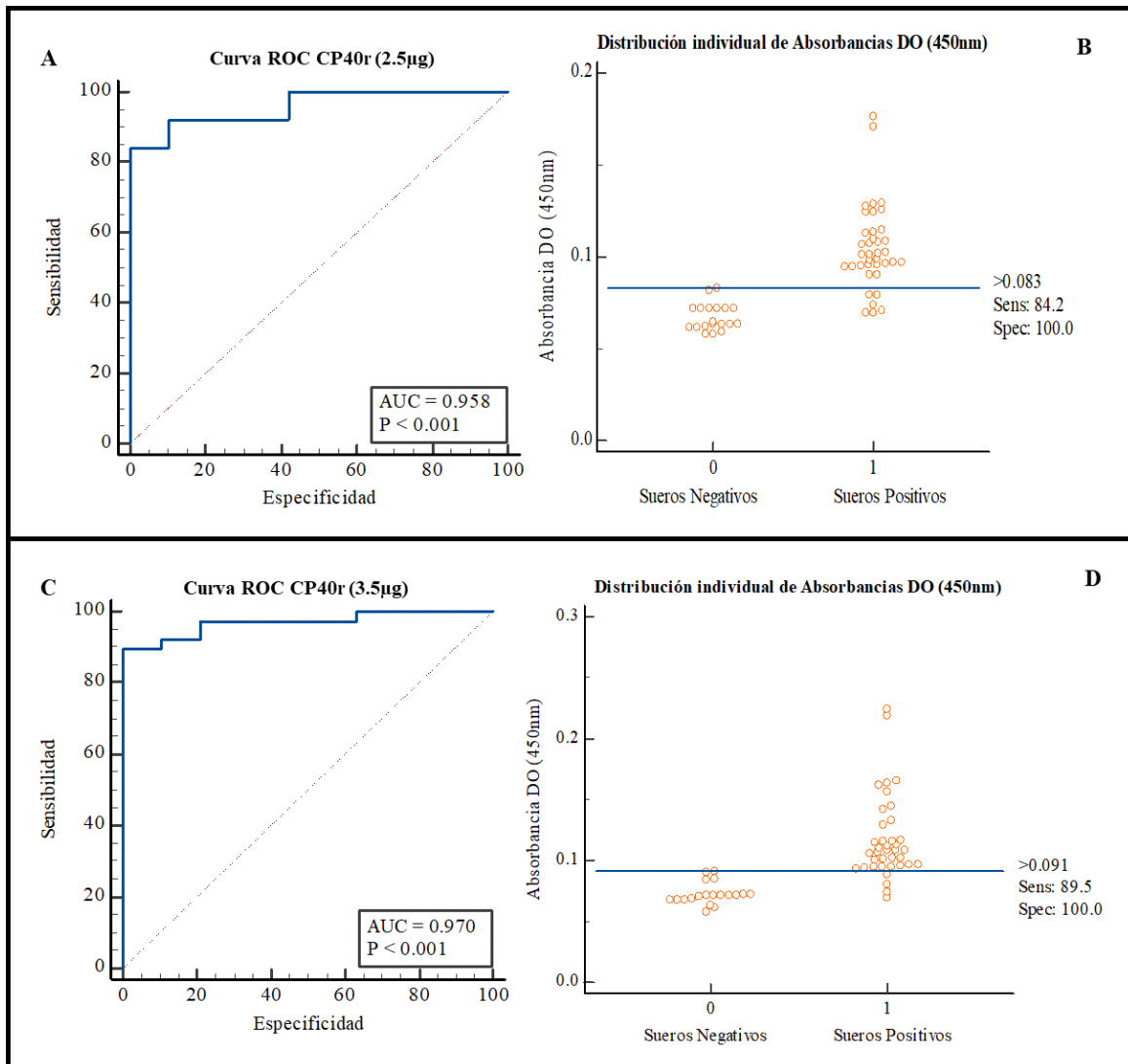


Figura 23. Análisis de la curva ROC para establecer el valor de corte de la prueba ELISA en la detección de anticuerpos anti-CP40r. Área bajo la curva (AUC) del ELISA indirecto utilizando como antígeno CP40r 2J-L (2.5 μ g) (**A**) y CP40r 2J-L (3.5 μ g) (**C**). Distribución individual de los resultados de absorbancia (DO) de las muestras de sueros de control negativo y positivo (**B-D**). En la gráfica se indican los valores de sensibilidad y especificidad con (95% IC). La línea azul representa el valor de corte para cada ensayo ($p < 0.001$).

El análisis de la curva ROC para el ELISA indirecto usando la combinación de ambas proteínas a una concentración de 2.5µg en una proporción 1:1 mostró un valor de corte de DO=0.08 con AUC = 0.899 para una sensibilidad de 87.2% y una especificidad de 91.7 %. También se evaluó el sistema ELISA con las proteínas a una concentración de 3.5µg donde el valor de corte fue de DO= 0.068 con AUC = 0.946 para una sensibilidad de 92.9 % y una especificidad del 100% (Figura 24).

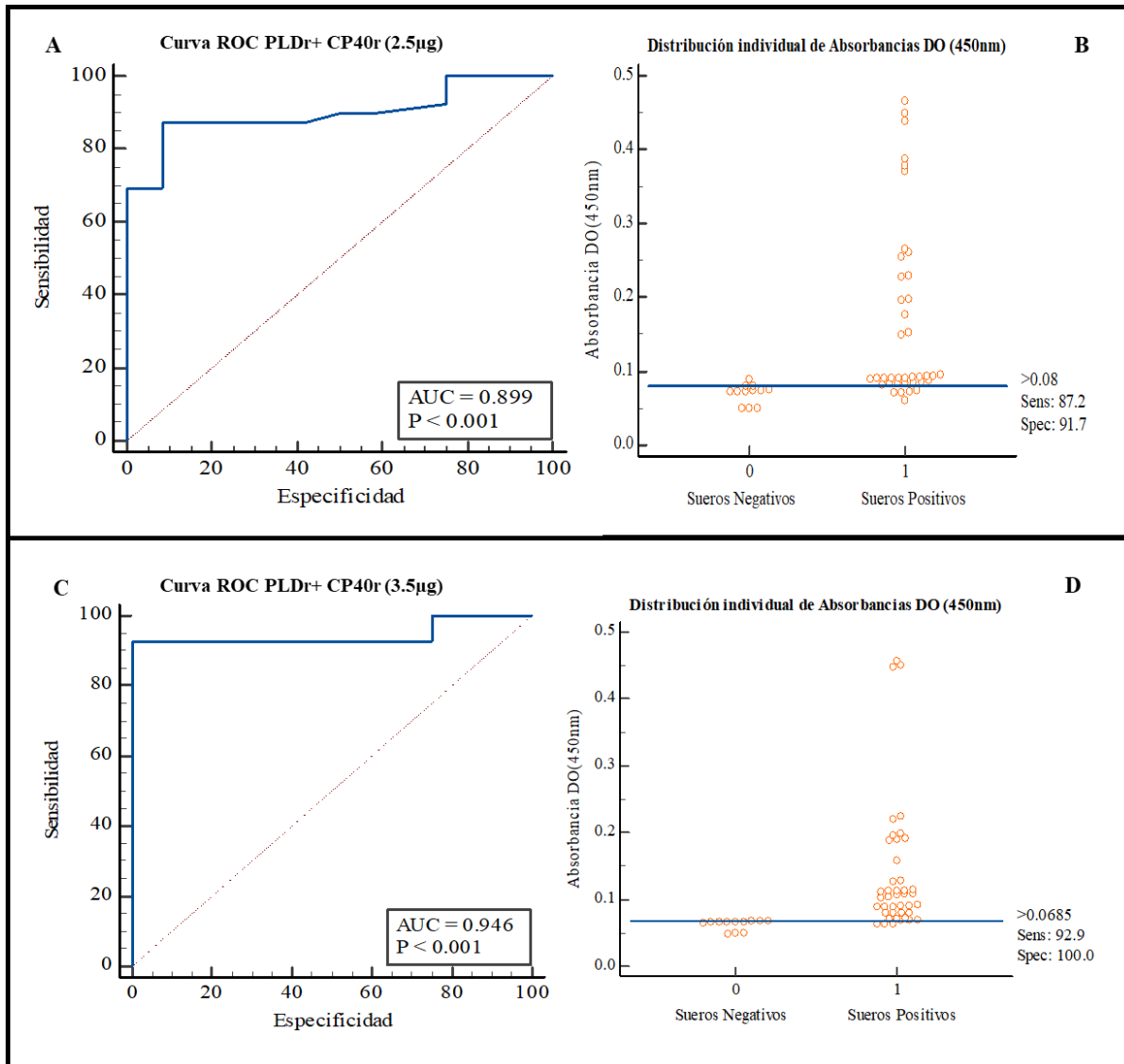


Figura 24. Curva ROC para establecer el valor de corte de la prueba ELISA anti PLDr+CP40r. Área bajo la curva (AUC) del ELISA indirecto usando como antígeno PLDr+CP40r (2.5µg) (A) y PLDr+CP40r (3.5µg) (C). Distribución individual de los resultados de absorbancia (DO) de las muestras de sueros de control negativo y positivo (B-D). En la gráfica se indican los valores de sensibilidad y especificidad (95% IC). La línea azul representa el valor de corte para cada ensayo (p<0.001).

Cuadro 15. Comparación de resultados de la normalización de los sistemas ELISA con las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

Antígeno	Concentración (µg/µL)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor de corte (DO)	AUC	Valor de p
PLDr	2.5	89.3	100	0.074	0.967	<0.001
	3.5	91.7	100	0.0835	0.975	<0.001
CP40r	2.5	84.2	100	0.083	0.958	<0.001
	3.5	89.5	100	0.091	0.970	<0.001
PLDr+CP40r	2.5	87.2	91.7	0.08	0.899	<0.001
	3.5	92.9	100	0.0685	0.946	<0.001

Para la determinación de los anticuerpos IgG totales de las muestras colectadas durante la evaluación de los formulados vacunales se utilizaron los sistemas ELISA con las proteínas a la concentración de 3.5µg.

VIII.3.5 Evaluación de la respuesta inmune humoral (IgG Totales) mediante la técnica de ELISA.

Los niveles de anticuerpos anti-PLD fueron evaluados durante el periodo de vacunación y luego del desafío mediante ELISA (Figura 25). Los animales del grupo G4 fueron positivos a partir del día 10 post primera inoculación con diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) en comparación con el resto de los grupos experimentales. Luego de los 21 días el grupo G3 presentó niveles elevados de anticuerpos anti-PLD solo superados por el grupo G4, ambos con diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$). Posterior al desafío los niveles de anticuerpos de los grupos controles G2 y G6 aumentaron en comparación con el grupo control sano (G1), sin diferencias entre sus valores. Los niveles de anticuerpos de los grupos G3 y G4 continuaron aumentando hasta el punto final del experimento, 30 días luego del desafío.

Los niveles de anticuerpos anti-CP40 fueron superiores en el grupo G3 en comparación con el grupo G5 a los 21 días de la primera inmunización, mientras que a los 15 días de administrada la 2da inmunización (día 36) el grupo G5 mostró resultados superiores. Luego del desafío el grupo G5 presentó los niveles de anticuerpos más elevados en comparación con los grupos controles y el grupo experimental G3 (Figura 26).

El ELISA para la detección de anticuerpos IgG totales anti PLD+CP40 permitió identificar a los 10 días un aumento significativo en el Grupo G3, mientras que a los 42 y 57 días el grupo G4 también aumento sus valores sin mostrar diferencias estadísticas significativas en comparación con los valores alcanzados por el grupo G3. También a los 57 días (15 días después del desafío) los animales evaluados de los grupos G2, G5 y G6 aumentaron los niveles de IgG sin diferencias estadísticas significativas entre ellos. Por otra parte a los 30

días post desafío los niveles de IgG del G3 fueron superiores al grupo G4 y G5 en comparación con los grupos controles (Figura 27).

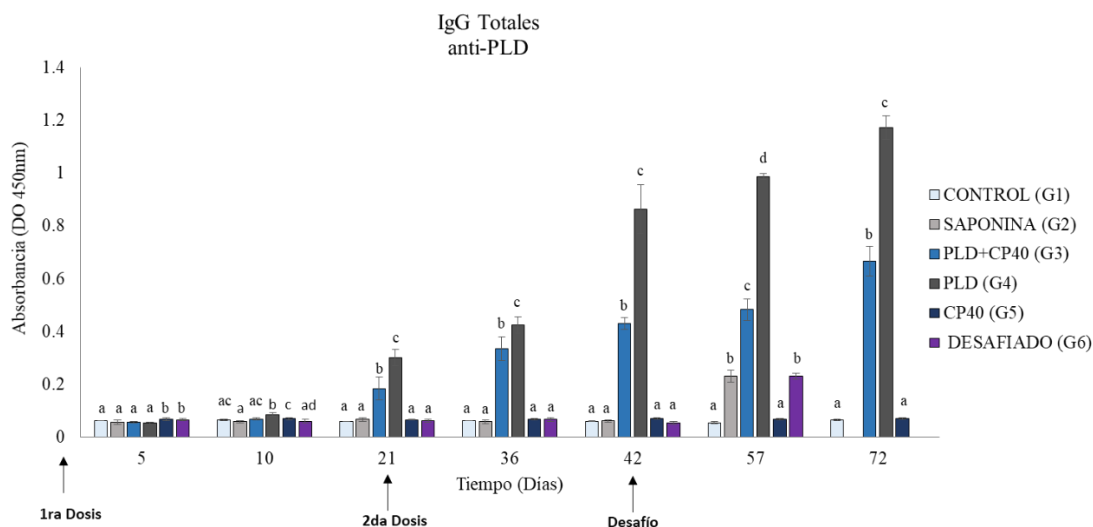


Figura 25. Niveles de anticuerpos totales IgG anti-PLD evaluados mediante ELISA. Día 0 al 21 (1ra dosis de formulados), día 21 al 42 (2da dosis de formulados), día 42 al 72 (30 días post desafío). Las barras indican la media de los valores (n=6) y la desviación estándar. La variación de las letras representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

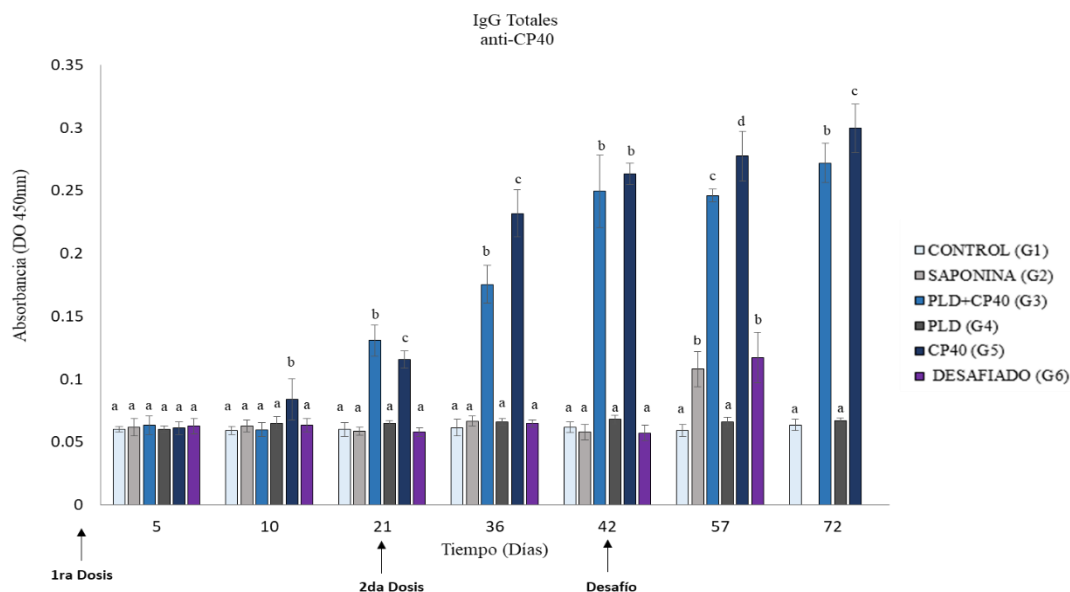


Figura 26. Niveles de anticuerpos totales IgG anti-CP40 evaluados mediante ELISA. Día 0 al 21 (1ra dosis de vacuna), día 21 al 42 (2da dosis de vacuna), día 42 al 72 (30 días post

desafío). Las barras indican la media (n=6) y la desviación estándar. La variación de las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

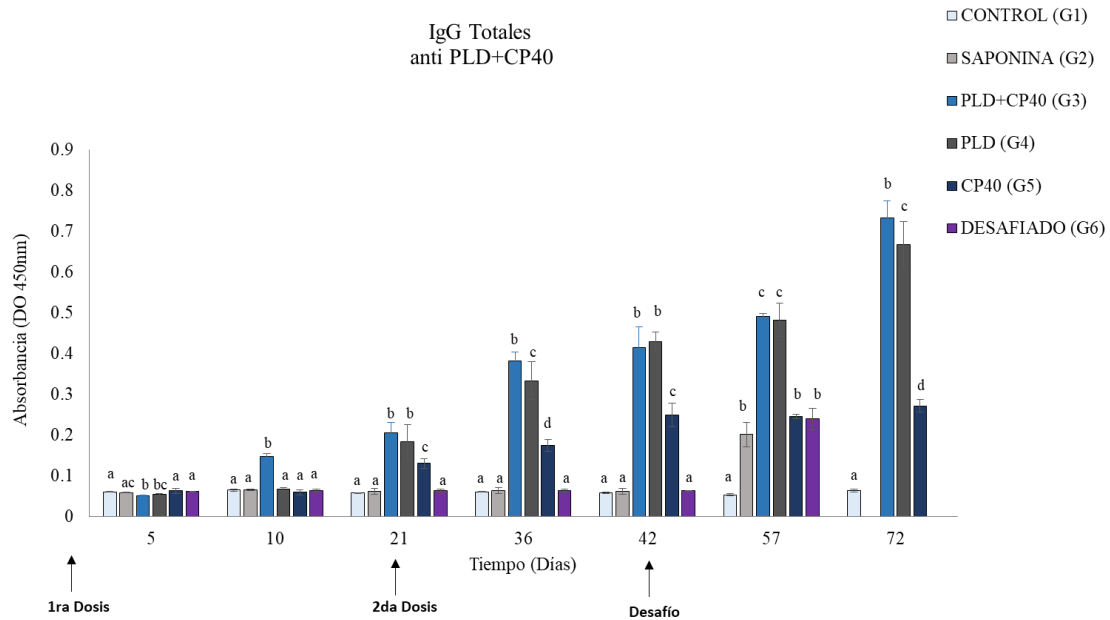


Figura 27. Niveles de anticuerpos totales IgG anti-PLD+CP40 evaluados mediante ELISA. Día 0 al 21 (1ra dosis de vacuna), día 21 al 42 (2da dosis de vacuna), día 42 al 72 (30 días post desafío). Las barras indican la media (n=6) y la desviación estándar. La variación de las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

VIII.3.6 Fenotipificación mediante Citometría de Flujo de las poblaciones celulares (Linf B, Linf T y Monocitos) del Bazo de los animales vacunados y desafiados.

Los esplenocitos se clasificaron en función de la dispersión frontal (FSC, por sus siglas del inglés *Forward scatter*) y la dispersión lateral (SSC, por sus siglas del inglés *Side scatter*), seleccionándose 10,000 eventos para cada sección de análisis. La identificación específica de las poblaciones se realizó teniendo en cuenta los marcadores: CD45 (leucocitos totales), CD19 (linfocitos B), CD3 (linfocitos T totales), CD4 (linfocitos T-cooperadores), CD8 (linfocitos T-citotóxicos) y CD14 (monocitos).

La determinación de la población de leucocitos se inició con el establecimiento de los parámetros morfológicos y moleculares a partir de muestras controles solo marcadas con cada uno de los marcadores por separados. La selección de los leucocitos totales para la diferenciación con otras poblaciones celulares del bazo se realizó a través del marcaje con CD45⁺, y de esta selección se evaluó la población correspondiente a los linfocitos B, linfocitos T y los monocitos (Figura 28).

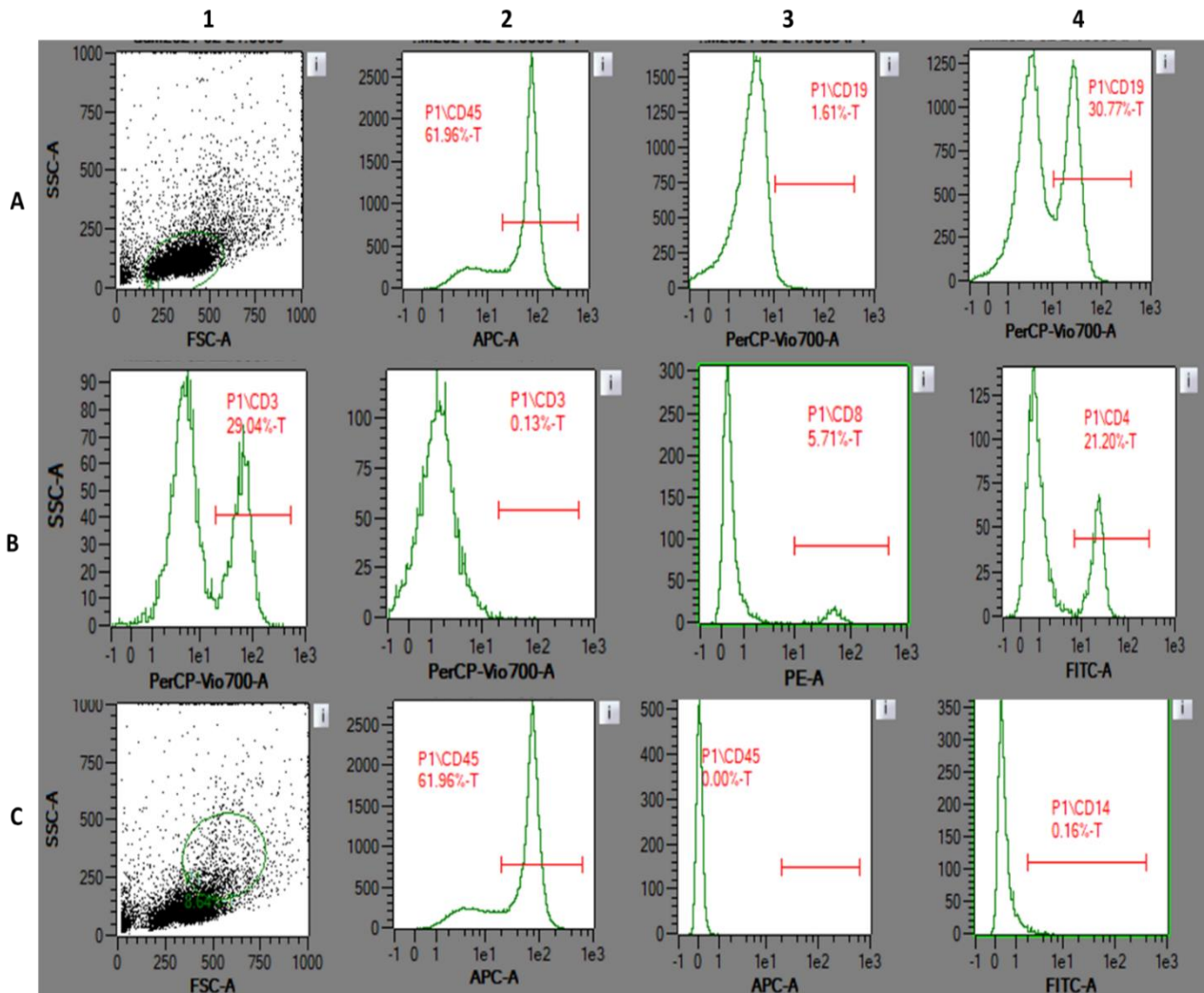


Figura 28. Selección de parámetros con muestras controles marcadas con los anticuerpos por separado. **(A-1)** Determinación en el dot plot de la región correspondiente a los leucocitos por tamaño y granularidad. En el eje x se representan los marcadores celulares *versus* SSC (eje y). **(A-2)** Histograma representativo de la expresión de leucocitos marcados con anti-CD45⁺. **(A3-4)** Histograma representativo de la expresión de linfocitos totales marcados con anti-CD19⁺. **(B1-2)** Histograma representativo de la expresión de linfocitos T totales marcados con anti-CD3⁺. **(B-3)** Histograma representativo de la expresión de linfocitos T marcados con anti-CD8⁺. **(B-4)** Histograma representativo de la expresión de linfocitos T marcados con anti-CD4⁺. **(C-1)** Determinación en el dot plot de la región correspondiente a los monocitos por tamaño y granularidad. **(C-2)** Histograma representativo de la expresión de leucocitos marcados con anti-CD45⁺. **(C3-4)** Histograma representativo de la expresión de monocitos marcados con anti-CD14⁺. En rojo se representa el porcentaje de células positivas. La línea roja indica la región que incluye a las células con el marcador celular.

La Figura 29 representa el análisis realizado para la fenotipificación de los linfocitos B con la determinación del porcentaje celular.

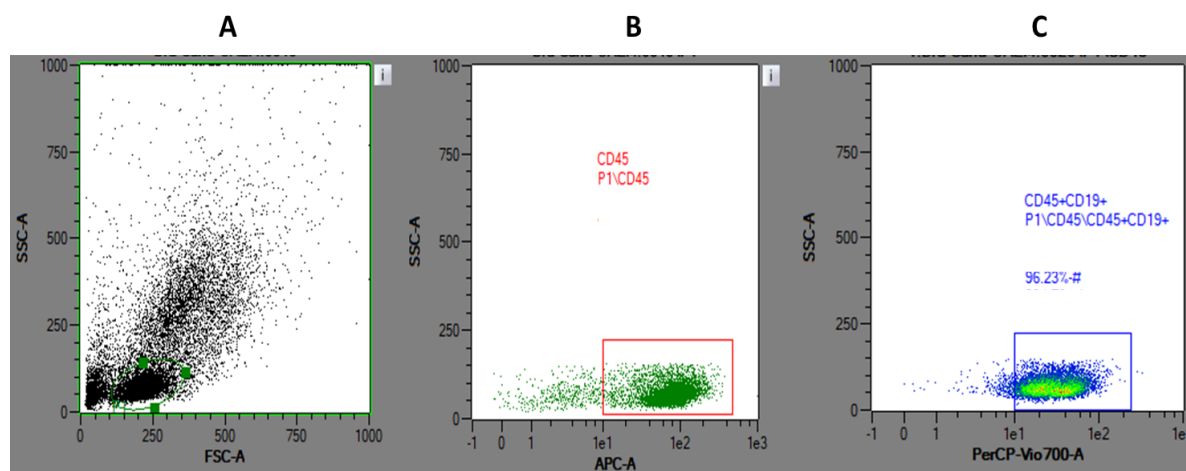


Figura 29. Identificación de la población de linfocitos B del bazo por Citometría de flujo. **(A)** Gráfico de puntos (dot plot) para la determinación de la región correspondiente a los linfocitos por tamaño y granularidad, el círculo verde representa la región seleccionada. **(B)** Gráfico de puntos de células marcadas con anti CD45⁺ fluorocromo APC (eje x) vs. SSC (eje y), el cuadro rojo representa la región correspondiente a los linfocitos CD45⁺. **(C)** Expresión de linfocitos B marcados con anti-CD19⁺ fluorocromo PerCP-Vio 700 CD45 (eje x) vs. SSC (eje y). El símbolo (#) indica el porcentaje de células CD45⁺/CD19⁺.

La fenotipificación de los linfocitos T se inició con el establecimiento de los parámetros morfológicos tamaño y granularidad, y posteriormente los parámetros moleculares con el marcaje de los receptores celulares CD45⁺, CD3⁺ y CD4⁺ o CD8⁺ (Figura 30).

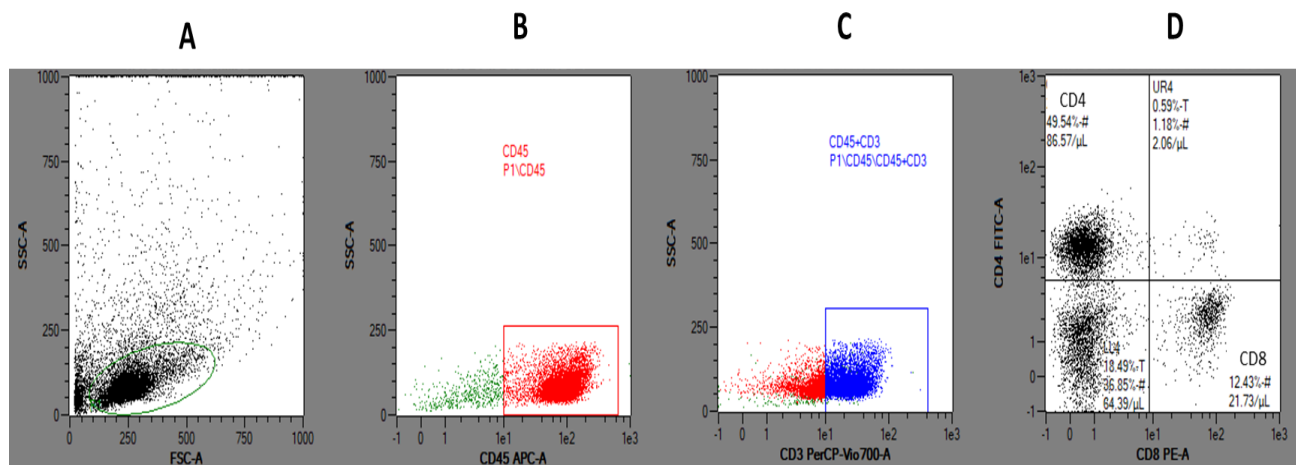


Figura 30. Identificación de la población de linfocitos T del bazo por Citometría de flujo. **(A)** Gráfico de puntos (dot plot) para la determinación de la región correspondiente a los linfocitos por tamaño y granularidad, el círculo verde representa la región seleccionada. **(B)**

Gráfico de puntos de células marcadas con anti CD45⁺ fluorocromo APC, el cuadro rojo representa la región correspondiente a los linfocitos CD45⁺. **(C)** Expresión de linfocitos T marcados con anti-CD3⁺ fluorocromo PerCP-Vio 700, el cuadro azul representa la región correspondiente a los linfocitos CD3⁺. **(D)** Expresión de linfocitos T CD8⁺ fluorocromo PE (eje x) vs. CD4⁺ fluorocromo FITC (eje y). El símbolo (#) indica el porcentaje de celular.

Para la identificación de los monocitos del bazo se realizó el análisis de las muestras por Citometría de flujo según lo especificado en la Figura 31.

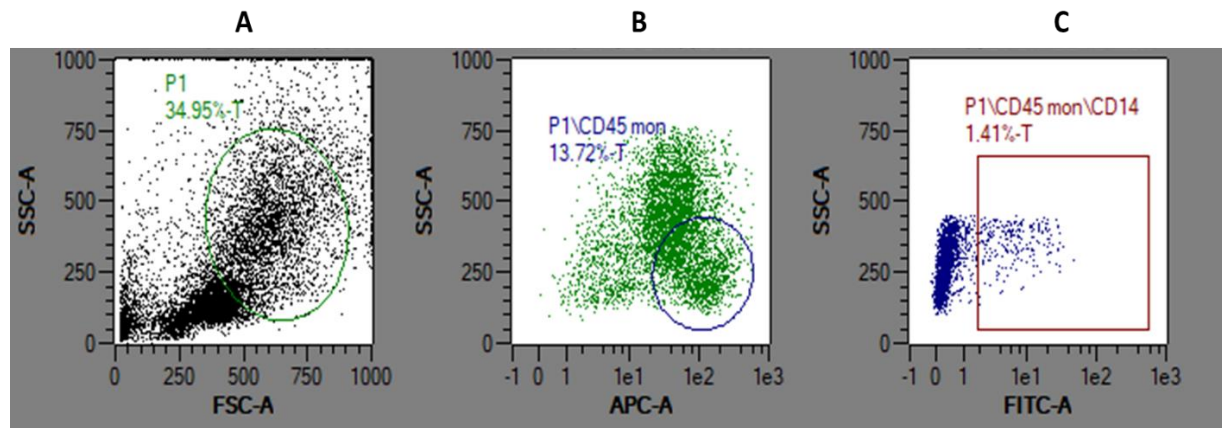


Figura 31. Identificación de la población de monocitos del bazo por Citometría de flujo. **(A)** Gráfico de puntos (dot plot) para la determinación de la región correspondiente a los monocitos por tamaño y granularidad, el círculo verde representa la región seleccionada. **(B)** Gráfico de puntos de células marcadas con anti CD45⁺ fluorocromo APC, el círculo azul representa la región correspondiente a los monocitos. **(C)** Expresión de monocitos marcados con anti-CD14⁺ fluorocromo FITC (eje x) vs. SSC (eje y), el cuadro rojo representa la región seleccionada). El símbolo (T) indica el porcentaje de celular.

El porcentaje de las diferentes poblaciones celulares evaluadas se muestran en el Cuadro 16.

El análisis estadístico de los porcentajes de linfocitos B del bazo de los animales de los diferentes grupos experimentales indicó que a los 21 días post primera dosis los grupos G3 y G4 presentaron los valores más elevados sin diferencias estadísticas entre ellos en comparación con el grupo G5 y los grupos controles G1 y G2. Al día 42 del experimento (21 post 2da dosis) el grupo G3 presentó el mayor porcentaje de células B, seguido de G4 y G5. A los 72 días del experimento (30 días post desafío) los grupos G3, G4 y G5 presentaron valores elevados, con diferencias estadísticas entre ellos ($p < 0.05$) (Figura 32).

Cuadro 16. Porcentaje de linfocitos B, linfocitos T y monocitos del bazo de animales vacunados y 30 días post desafío determinados mediante Citometría de Flujo.

Población celular	Días	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Linf B (CD19)	21	37.97	38.77	51.91	49.26	43.40
	42	37.5	38.5	65.85	60.4	50.7
	72	49.47	-	95.21	90.5	80.3
Linf T (CD3)	21	43.54	41.26	55.46	50.84	54.51
	42	37.72	42.47	60.5	55.95	57.3
	72	38.43	-	73.61	65.51	60.68
Linf T (CD4)	21	46.30	54.29	68.43	60.86	54.74
	42	44.69	55.56	69.19	62.27	63.95
	72	43.83	0	73.78	65.51	61.03
Linf T (CD8)	21	15.55	17.06	21.17	19.72	24.75
	42	14.89	17.63	24.66	21.84	22.66
	72	14.43	-	25.75	18.93	20.06
Monocitos (CD14)	21	0.65	0.76	1.03	0.84	0.62
	42	0.64	0.18	0.46	0.16	0.08
	72	0.61	-	7.39	2.08	1.77

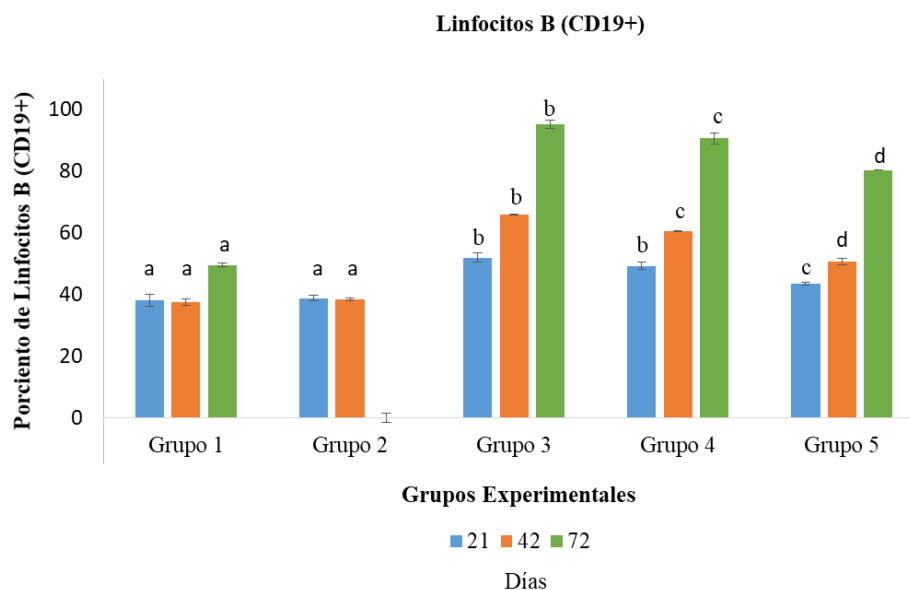


Figura 32. Porcentaje de Linfocitos B del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 (72 días). Las barras representan la media y la desviación estándar de los

valores de 3 ratones evaluados por cada grupo. La variación de las letras indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

La estimación de linfocitos T totales marcados con anti-CD3⁺ no mostró diferencias estadísticas significativas entre los grupos G3, G4 y G5 a los 21 días post primera dosis (Figura 33). Luego de la segunda dosis los grupos G3 y G5 mostraron los valores superiores en comparación con G4. A los 30 días post desafío el porcentaje de células TCD3⁺ fue diferente entre los grupos con un aumento significativo entre los grupos G3, G4 y G5 siendo este último el de menor porcentaje.

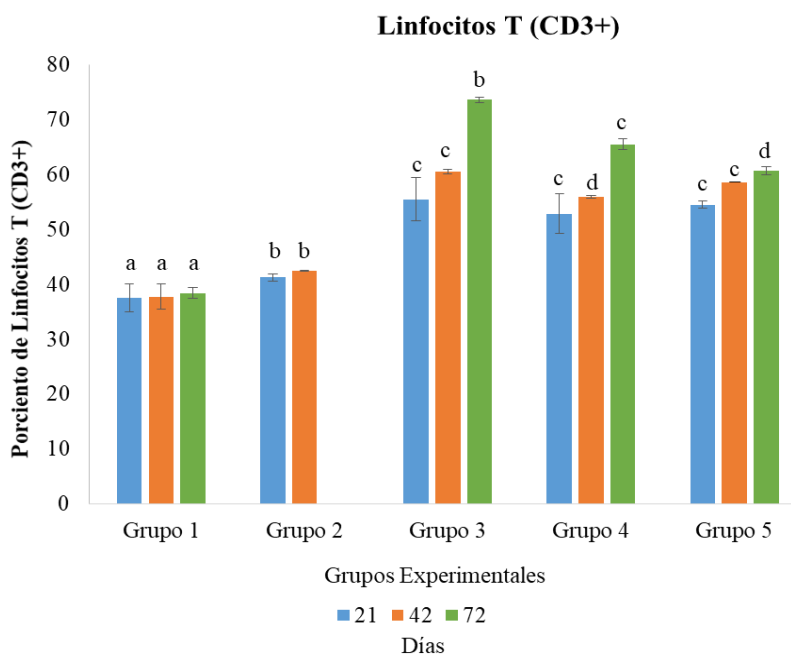


Figura 33. Porcentaje de Linfocitos T CD3⁺ del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 (72 días). Las barras indican la media y la desviación estándar de los valores de 3 ratones evaluados por cada grupo. La variación de las letras indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ fue superior en el grupo G3 a los 21 días post primera dosis, seguido del grupo G4 y G5. A los 42 días el grupo G3 se mantuvo con valores elevados, mientras que G4 y G5 mostraron valores similares. Luego del desafío el comportamiento entre los grupos fue similar con un aumento significativo en el porcentaje celular en los grupos G3, G4 y G5 (Figura 34).

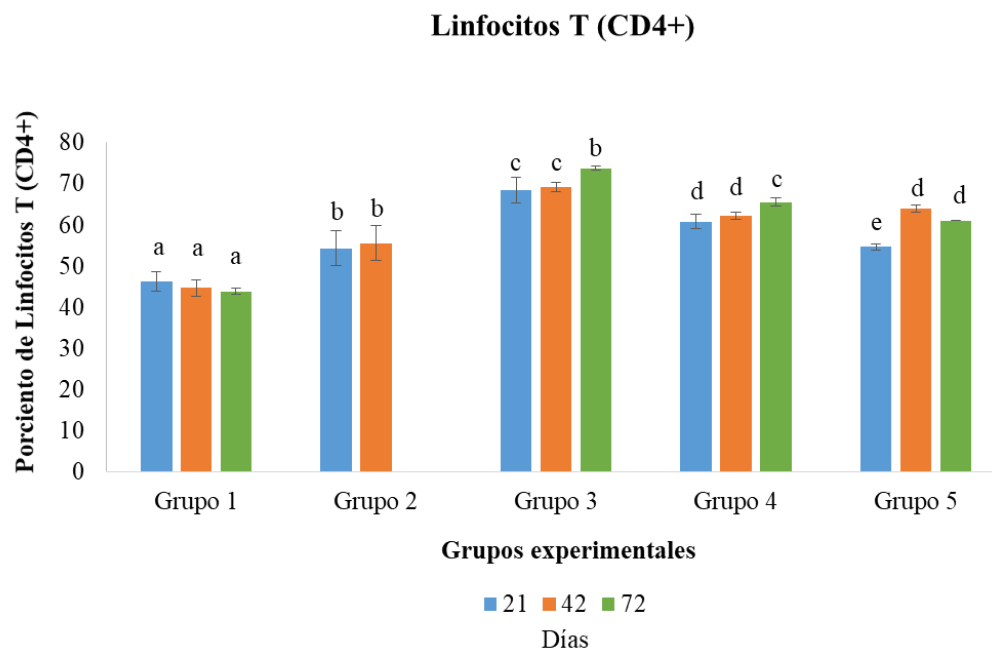


Figura 34. Porcentaje de Linfocitos T CD4⁺ del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 (72 días). Las barras indican la media y la desviación estándar de los valores de 3 ratones evaluados por cada grupo. La variación de las letras indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

Los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ se presentan en la Figura 35, donde los valores alcanzados a los 21 días post primera dosis fueron superiores en el grupo G5 con diferencias estadísticas significativas en comparación con el resto de los grupos. Luego de 21 días de la inoculación de la segunda dosis de los formulados (42 días) el porcentaje de células fue superior en el grupo G3 y similar entre los grupos G4 y G5. La evaluación del porcentaje celular luego de 30 días post desafío (72 días) indicó que el grupo G3 presentó los valores superiores, seguido de G5 y luego G4.

La identificación de los monocitos del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 (72 días) se muestran en la Figura 36. El porcentaje de esta población celular fue superior en el grupo G3 luego del desafío en comparación con el resto de los grupos experimentales.

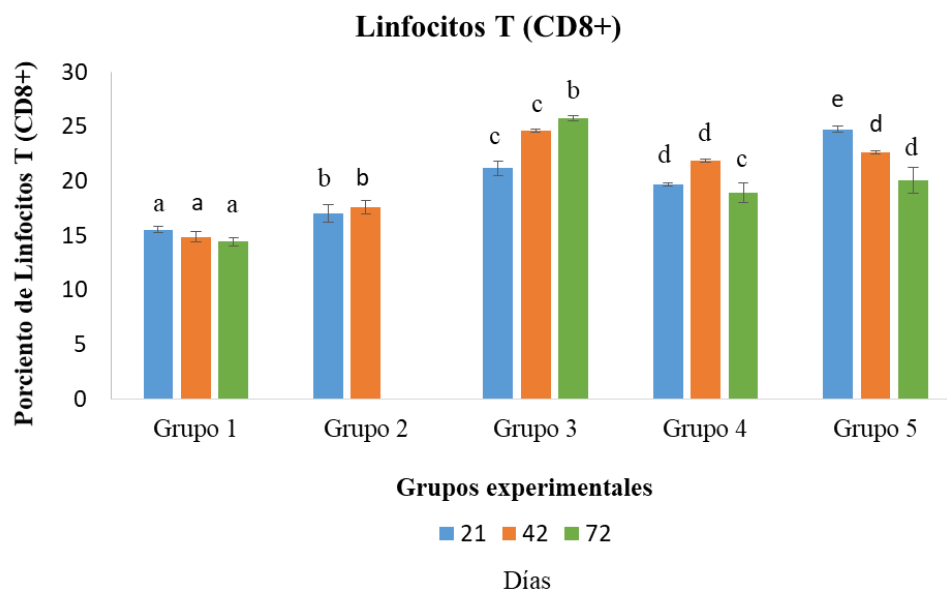


Figura 35. Porcentaje de Linfocitos T CD8⁺ del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 (72 días). Las barras indican la media y la desviación estándar de los valores de 3 ratones evaluados por cada grupo. La variación de las letras indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

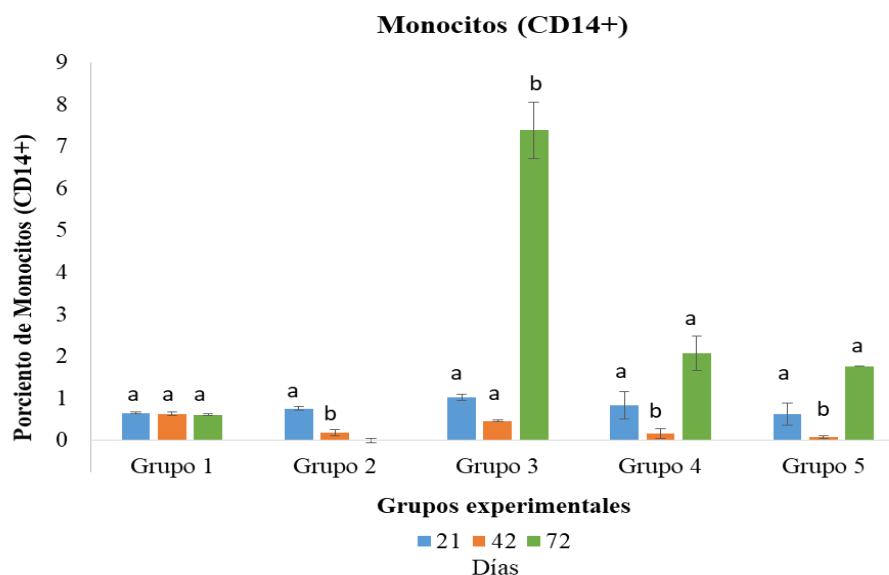


Figura 36. Porcentaje de monocitos CD14⁺ del bazo de ratones BALB/c inoculados con los formulados vacunales y 30 días post desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*

cepa ATCC 43926 (72 días). Las barras indican la media y la desviación estándar de los valores de 3 ratones evaluados por cada grupo. La variación de las letras indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

En la Figura 37 se representan los porcentajes celulares de las poblaciones evaluadas por grupo experimental a los 30 días post desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926.

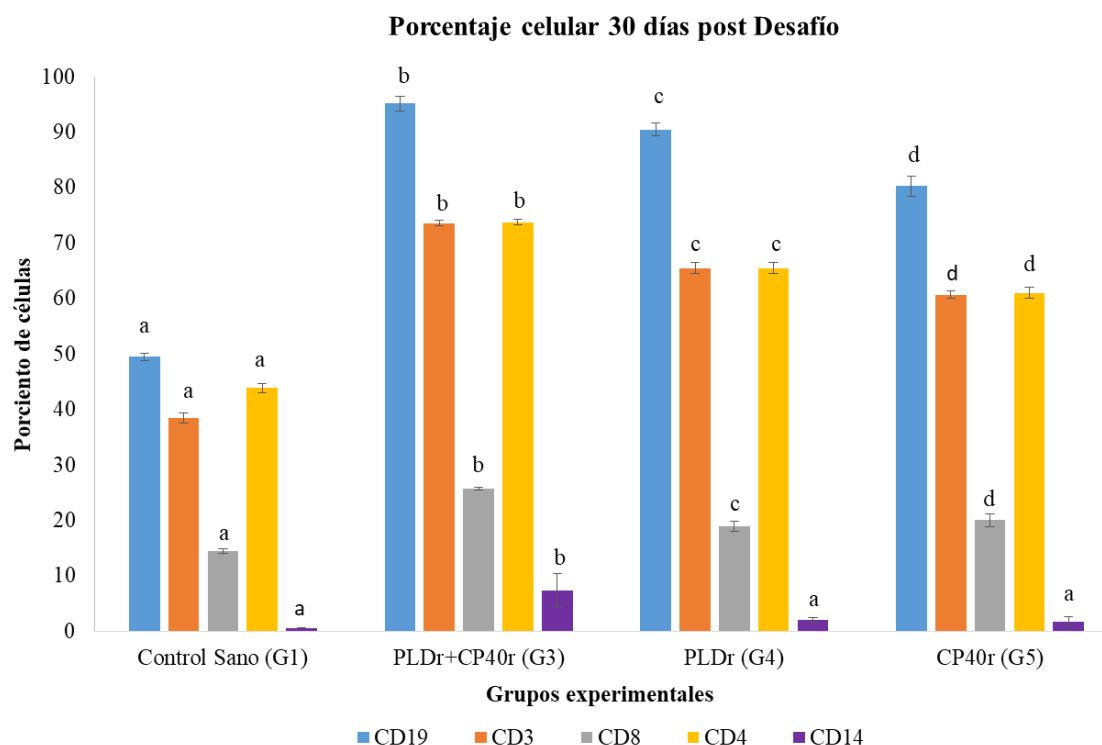


Figura 37. Porcentaje de las poblaciones celulares del bazo de ratones BALB/c vacunados y desafiados con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 (30 días post desafío). Las barras indican la media y la desviación estándar de los valores de 3 ratones evaluados por cada grupo. La variación de las letras indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales.

VIII. RESULTADOS: PUBLICACIONES

<https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5699>

Revisión bibliográfica

Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas. Revisión

Maria Carla Rodríguez Domínguez ^a

Roberto Montes de Oca Jiménez ^{a*}

Jorge Antonio Varela Guerreño ^a

^a Universidad Autónoma del Estado de México. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. km 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México, México.

* Autor de correspondencia: romojimenez@yahoo.com

Resumen:

La linfadenitis caseosa es una enfermedad que afecta la producción ovina y caprina a nivel mundial. El agente etiológico es una bacteria Gram positiva, intracelular facultativa denominada *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. La enfermedad puede cursar con un desarrollo cutáneo o visceral, provocando deterioro en la condición física del animal, así como pérdidas en la producción de leche y carne, decomiso de las canales, rechazo de las pieles y como consecuencia, grandes pérdidas económicas. El estudio de los factores de virulencia y los mecanismos de patogénesis han permitido comprender esta enfermedad, así como establecer las moléculas diana para el desarrollo de nuevas vacunas. Existen vacunas comerciales disponibles a nivel mundial; sin embargo, la protección conferida por éstas no ha sido eficaz en el control de la enfermedad. Actualmente el uso de nuevas tecnologías ha permitido la obtención y caracterización de proteínas con potencial inmunogénico para el desarrollo de nuevas vacunas, las cuales podrían ser una alternativa para incrementar la protección. En el presente trabajo se exponen los principales factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sus implicaciones en la patogénesis y las tendencias actuales en las formulaciones vacunales.



ISOLATION, CLONING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *pld* AND *cp40*, VIRULENCE FACTORS OF A MEXICAN ISOLATE OF *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* †

[AISLAMIENTO, CLONAJE Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE *pld* Y *cp40*, FACTORES DE VIRULENCIA DE UN AISLADO MEXICANO DE *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*]

Maria Carla Rodríguez-Domínguez¹, Roberto Montes-de-Oca-Jiménez^{1*},
Alberto Barbabosa-Pliego¹, Efrén Díaz-Aparicio²,
Jorge Antonio Varela-Guerrero¹ and Esvieta Tenorio-Borroto¹

¹ Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, km 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlaquilco, Toluca, Estado de México, México, C.P. 50200. Email: romojimenez@yahoo.com

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, (INIFAP). CENID, Salud Animal e Inocuidad. Carretera México-Toluca, colonia Palo Alto, Ciudad de México, México, C.P. 05110.

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Caseous lymphadenitis is a worldwide distribute disease that affects the sheep and goat industry. *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* is a facultative intracellular Gram-positive bacterium, considered the etiologic agent of the disease. Complete genome sequences of Mexican isolates have been obtained and different strain has been previously characterized. The study of virulence factors allows establishing potential candidates for the development of vaccines and diagnostic tools. **Objective.** To identify the complete *pld* and *cp40* genes sequence from a Mexican isolate of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, principal virulence factors. **Methodology.** *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolate 2J-L was obtained from an abscess of a sheep of the State of Jalisco. The complete *pld* and *cp40* genes were amplified by PCR, cloned into a replicative vector and sequenced by Sanger automatic sequencing. Gene sequences conservancy was established, analyzing homology across previously reported genes of Mexican strains MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 and MEX29. **Results.** Sequences of *pld* and *cp40* genes from isolate 2J-L presented high percentages of similarity (99%) in comparison with the sequences of other isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, reported in the GenBank database. The analysis of nucleotide sequence homology and phylogenetic tree based on *pld* and *cp40* directed the observation that 2J-L is related to Mexican strain MEX29 and MEX25. Phylogenetic results agreed on the idea that strains biovar *ovis* and biovar *equi* are groupings on different clades. Finally, results indicate that Mexican strains are more similar among strains isolated from the same host type, without geography distance influence. **Implications.** The analysis pointed out that both genes conserve their sequences in comparison with Mexican and international strains, which encourages the research continuity for vaccine and diagnostic tools development using proteins PLD and CP40 as antigen targets. **Conclusions.** The complete *pld* and *cp40* genes from Mexican isolate 2J-L were amplified, cloned and analyzed; important virulence factors from *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Key words: Caseous lymphadenitis; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Mexican isolate; *pld*; *cp40*.

RESUMEN

Antecedentes. La linfadenitis caseosa es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial que afecta a la industria del ganado ovino y caprino. *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* es una bacteria Gram-positiva intracelular facultativa, considerada el agente etiológico de la enfermedad. Secuencias del genoma completo de aislados mexicanos se han obtenido y caracterizado previamente. El estudio de factores de virulencia permite establecer candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas y herramientas de diagnóstico. **Objetivo.** El objetivo de este trabajo fue identificar la secuencia completa de los genes *pld* y *cp40* de un aislado mexicano de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, principales factores de virulencia. **Metodología.** El aislado 2J-L de *Corynebacterium pseudotuberculosis* se obtuvo de un absceso proveniente de una oveja del Estado de Jalisco. Los genes *pld* y *cp40* se

† Submitted May 7, 2021 – Accepted March 27, 2022.



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
ISSN: 1870-0462.



Article

Bioinformatic Approach of B and T Cell Epitopes of PLD and CP40 Proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* Mexican Isolate 2J-L towards a Peptide-Based Vaccine

Maria Carla Rodríguez-Domínguez ¹, Roberto Montes-de-Oca-Jiménez ^{1,2,*}, Juan Carlos Vázquez-Chagoyán ¹, Pilar Eliana Rivadeneira-Barreiro ³, Pablo Cleomenes Zambrano-Rodríguez ³, Martha Elba Ruiz-Riva-Palacio ², Adriana del Carmen Gutiérrez-Castillo ¹, Siomar de-Castro-Soares ⁴, Patricia Vieyra-Reyes ¹ and Gabriel Arteaga-Troncoso ^{5,6}

¹ Research and Advanced Studies in Animal Health Center, Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnia, Autonomy University of the State of Mexico, Km 15.5 Toluca Pan-American Highway Atlacomulco, Toluca C.P. 50200, State of Mexico, Mexico; mariacarlarodriguezdominguez@gmail.com (M.C.R.-D.); jcvch@yahoo.com (J.C.V.-C.); agutiérrez@uaemex.mx (A.d.C.G.-C.); pvieyra@uaemex.mx (P.V.-R.)

² Sor Juana Inés de la Cruz School, Autonomy University of the State of Mexico- AMECAMECA, Amecameca de Juárez C.P. 56900, State of Mexico, Mexico; prometeoriz@hotmail.com

³ Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Sciences, Technical University of Manabí, Urbina Avenue, Portoviejo C.P. 130105, Portoviejo, Ecuador; pilarrb26@hotmail.com (P.E.R.-B.); drpablozambrano@gmail.com (P.C.Z.-R.)

⁴ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Triângulo Mineiro, Av. Frei Paulino, 30-Nossa Sra. da Abadia, Uberaba-MG C.P. 38025-180 Uberaba, Minas Gerais, Brazil; siomars@gmail.com

⁵ Department of Cellular Biology and Development, National Institute of Perinatology, Lomas de Chapultepec IV Secc, Miguel Hidalgo, Mexico City C.P. 11000, Mexico; drgarteaga@yahoo.com.mx

⁶ Military school of Health Officers, University of the Mexican Army and Air Force, SEDENA, Mexico City C.P. 11650, Mexico

* Correspondence: romojimenez@yahoo.com



Citation: Rodríguez-Domínguez, M.C.; Montes-de-Oca-Jiménez, R.; Vázquez-Chagoyán, J.C.; Rivadeneira-Barreiro, P.E.; Zambrano-Rodríguez, P.C.; Gutiérrez-Castillo, A.d.C.; de-Castro-Soares, S.; Vieyra-Reyes, P.; Arteaga-Troncoso, G. Bioinformatic Approach of B and T Cell Epitopes of PLD and CP40 Proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* Mexican Isolate 2J-L towards a Peptide-Based Vaccine. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 270. <https://doi.org/10.3390/ijms25010270>

Academic Editor: Suzana K. Straus

Received: 19 October 2023

Revised: 8 December 2023

Accepted: 10 December 2023

Published: 23 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Mapping B and T cell epitopes constitutes an important action for peptide vaccine design. PLD and CP40 virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*, a causal agent of Caseous Lymphadenitis, have been evaluated in a murine model as good candidates for vaccine development. Therefore, the goal of this work was to in silico analyze B and T cell epitopes of the PLD and CP40 proteins of a Mexican isolate of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*. The Immune Epitope Data Base and Resource website was employed to predict the linear and conformational B-cell, T CD4+, and T CD8+ epitopes of PLD and CP40 proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* Mexican strain 2J-L. Fifty B cell epitopes for PLD 2J-L and forty-seven for CP40 2J-L were estimated. In addition, T CD4+ and CD8+ cell epitopes were predicted for PLD 2J-L (MHC I:16 epitopes, MHC II:10 epitopes) and CP40 2J-L (MHC I: 15 epitopes, MHC II: 13 epitopes). This study provides epitopes, paying particular attention to sequences selected by different predictor programs and overlap sequences as B and T cell epitopes. PLD 2J-L and CP40 2J-L protein epitopes may aid in the design of a promising peptide-based vaccine against Caseous Lymphadenitis in Mexico.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*; T cell epitopes; B cell epitopes; PLD; CP40; peptides; caseous lymphadenitis

1. Introduction

Reverse vaccinology is a branch of immunoinformatics, and is also known as the in silico search for vaccine candidates. The computational analysis constitutes an alternative tool, allowing the characterization of potential vaccine candidates, avoiding pathogen microorganism cultures, the use of experimental animals in the early stages of design, and achieving significant savings in research time and costs [1]. This technology was first

Capítulo de Libro: Linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos, vacunas y perspectivas de investigación en México. Libro: Actualidad y prospectiva de la investigación científica en el Centro Universitario Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México, Primera edición, Editorial Academia Internacional de Ciencias Político-Administrativas y Estudios de Futuro, Ciudad de México, México, 2021. ISBN: 978-607-98268-6-4. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/112227>.

Linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos, vacunas y perspectivas de investigación en México

Roberto Montes de Oca Jiménez^{1*}, María Carla Rodríguez Domínguez²

Humberto Gustavo Monroy Salazar³.

Resumen: La linfadenitis caseosa es una enfermedad que afecta la producción ovina y caprina a nivel mundial. El agente etiológico es una bacteria Gram positiva, intracelular facultativa denominada *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis. La enfermedad puede cursar con un desarrollo cutáneo o visceral, provocando pérdidas en la producción de leche y carne, decomiso de las canales, rechazo de las pieles y como consecuencia, grandes pérdidas económicas. Existen vacunas comerciales pero la protección conferida por estas no ha sido eficaz en el control de la enfermedad. Actualmente el uso de nuevas tecnologías ha permitido la obtención y caracterización de proteínas con potencial inmunogénico para el desarrollo de nuevas vacunas, las cuales podrían ser una alternativa para incrementar la protección. El presente trabajo incluye una revisión de las temáticas referentes al microorganismo patógeno, las características de la enfermedad, así como las tendencias en el desarrollo de vacunas e investigación en México.

Palabras clave: Linfadenitis caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Vacunas, Investigación en México

Introducción

La Linfadenitis Caseosa (LAC) es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano, también llamada pseudotuberculosis o enfermedad de Preisz-Nocard, la cual conlleva a importantes pérdidas económicas en el sector ganadero, principalmente el ovino y caprino. El microorganismo agente causal de la enfermedad fue identificado en 1888 de un caso clínico de linfangitis en bovinos por Edmond Isidore Etienne Nocard y posteriormente en 1891 Hugo von Preisz aisló la bacteria de un absceso de riñón ovino. Como consecuencia de estos hallazgos el microorganismo se nombró como bacilo "Priez-Nocard" y en 1948 se estableció según la 6ta edición del Manual del Bergy's el nombre *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) (Von-Graevenitz y Bernard, 2006). La LAC ocasiona daños a la ganadería a nivel mundial, con pérdidas de rendimiento en el rebaño, con menor ganancia de peso y decomiso de las vísceras afectadas (Windsor, 2011), disminución de la producción de lana (Paton *et al.*, 1994), carne (Collet *et al.*, 1994) y leche (Schreuder *et al.*, 1990), así como desórdenes reproductivos (Odiah *et al.*, 2017; Faeza *et al.*, 2019).

La LAC ha sido identificada en diversos países, dentro de los que se encuentran productores ovinos de reconocimiento mundial, como Australia (Windsor, 2014), Nueva Zelanda (Valero *et al.*, 1992), China (Gao *et al.*, 2018), Estados Unidos (Williamson, 2001), Canadá (Debien *et al.*, 2013), Brasil (de Farais *et al.*, 2019) y México (Parise *et al.*, 2018). La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial aunque a veces es poco notificada, siendo identificados como factores de riesgo el tipo de explotación y los protocolos de manejo y control establecidos en las granjas.

Encuestas epidemiológicas realizadas en Australia, uno de los principales países productores y exportadores de pequeños rumiantes (Behrendt y Weeks, 2019), evidencian que la enfermedad se encuentra distribuida en granjas de diferentes regiones del país como Nueva Gales del Sur (97%), región de Victoria (91%) y en Australia occidental (88%). Un análisis de la prevalencia de la enfermedad se realizó a partir del muestreo de 1,604,659 ovejas sacrificadas, indicando que la enfermedad estaba presente en la región de Victoria para un 12.9%, Tasmania con 12.8% seguido de

¹ *Roberto Montes de Oca Jiménez, Profesor de Tiempo Completo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, CP 50295, Toluca, Estado de México. Profesor del Centro Universitario UAEM Amecameca, Carretera Amecameca - Ayapango, Amecameca, Estado de México. México. C.P. 50900.

² Humberto Gustavo Monroy Salazar, Profesor de Tiempo Completo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, CP 50295, Toluca, Estado de México.

Capítulo de Libro: Identificación *in silico* de la red de interacción de factores de virulencia PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislado mexicano 2JL. Libro: Análisis de Investigaciones Agroforestales, Veterinarias y en Estadística, Primera edición, versión electrónica, Editorial ABANICO ACADÉMICO-AMATE, Guadalajara, México, 2023. ISBN: 978-607-59961-5-8. DOI: <https://doi.org/10.21929/abanico/2023.1>

Análisis de Investigaciones Agroforestales, Veterinarias y en Estadística



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

Roberto Montes de Oca Jiménez¹, María Carla Rodríguez Domínguez¹, Martha Elba Ruiz Riva Palacio²

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

Introducción

La Linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad bacteriana que afecta principalmente a pequeños rumiantes, cuyo agente causal es *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) biovar *ovis*. La enfermedad se presenta de forma cutánea y/o visceral, siendo en la primera característica la formación de abscesos en nódulos linfáticos subcutáneos, los cuales son visibles y palpables a través de la piel y su localización depende del punto de entrada del microorganismo. Las lesiones pueden aparecer como abscesos organizados, con inflamación, encapsulación fibrosa, pérdida de pelo sobrepuesto y ruptura eventual, dando como resultado la descarga de contenido purulento. En la forma visceral, los abscesos tienen lugar en los nódulos linfáticos internos, así como en pulmones, hígado y riñones, causando deterioro en la condición orgánica del animal hacia el desarrollo de un curso crónico. En el establecimiento de la infección se requiere de la adhesión a las células del hospedero, multiplicación intracelular, diseminación a otros tejidos y persistencia. Las proteínas PLD y CP40 constituyen factores de virulencia principales de *C. pseudotuberculosis ovis*, consideradas proteínas exportadas o secretadas por la bacteria, que favorecen la infección ya sea involucradas en la adhesión e invasión de las células del hospedero, en la adquisición de nutrientes, toxicidad y en la evasión del sistema inmune. Aun se continúa con el estudio de los factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, para establecer el conjunto de proteínas que participan en interacción para el establecimiento de la infección bacteriana.

En los últimos años la ovinocultura mexicana se ha fortalecido de manera considerable, por lo que las investigaciones se han dirigido al estudio de patógenos que afectan la producción de pequeños rumiantes. La Linfadenitis caseosa es una enfermedad que se encuentra presente en el territorio mexicano y es considerada una de las enfermedades infecciosas económicamente más importantes que afecta la producción ovina y caprina. En México diversos estudios han demostrado la presencia de la LAC en los rebaños ovinos y caprinos en diferentes regiones del país. En el 2015 se realizó la identificación de 57 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de un total de 160 muestras procedentes del Estado de Jalisco. Las cepas se identificaron mediante bacteriología miniaturizada

IX. DISCUSIÓN

IX. 1. Predicción *in silico* de la actividad inmunogénica de las proteínas recombinantes PLDr y CP40r derivadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L.

Las proteínas recombinantes PLDr y CP40r constituyen factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L procedente de un absceso de oveja del Estado de Jalisco (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2021). En estudios previos el potencial inmunogénico de ambas proteínas fue evaluado *in silico* con la determinación de epítomos de linfocitos B y la aplicación de programas de vacunología inversa, mostrando resultados prometedores para el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2020). Para complementar la caracterización de estas moléculas se realizó la determinación *in silico* de la red de interacción de proteínas, la predicción de epítomos de linfocitos T en el contexto de la presentación de antígenos mediada por el MHC-I y MHC-II, así como la simulación de la respuesta inmune humoral y celular ante la aplicación de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como antígenos en un formulado vacunal.

IX.1.1 Red de interacción de las proteínas recombinantes PLDr y CP40r de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L.

El análisis de la red de interacción de proteínas para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L brindó información de las funciones y roles de acción de estos factores de virulencia en la maquinaria bacteriana. La red establecida para la proteína PLDr 2J-L indicó relación de co-ocurrencia filogenética con nanH, Neuroaminidasa sialidasa, proteína que contribuye al reconocimiento de los ácidos siálicos expuestos en las superficies de las células del hospedero. Una función importante de los ácidos siálicos en las células del hospedero es la regulación de la inmunidad innata, y en función de esta característica los patógenos han desarrollado estrategias para presentar en sus superficies oligosacáridos sialilados que imitan a los del hospedero. Se ha demostrado que la enzima NanH de *Corynebacterium diphtheriae* participa en la síntesis de oligosacáridos sialílicos a través de una reacción de transglicosilación, siendo aceptora de fracciones de la galactosa de ácido siálico del hospedero (Kim *et al.*, 2010). También los ácidos siálicos pueden ser utilizados por la bacteria como fuente de carbono, nitrógeno, energía y precursores de la biosíntesis de la pared celular (Vimr *et al.*, 2004). La inoculación de la proteína NanH obtenida vía recombinante formulada con adyuvante saponina ha mostrado un 60% de protección en ratones desafiados con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, con un perfil de respuesta inmune Th1, considerándose como un factor de virulencia prometedor en el desarrollo de una vacuna (Thais de Oliveira *et al.*, 2020). Aunque en la red la interacción entre NanH y PLDr 2J-L no mostró relación de tipo co-expresión, se ha demostrado mediante cuantificación por qRT-PCR que los genes de *pld*, *cp40*, *nanH* (neuraminidasa H), *sodC*

(superóxido dismutasa C) y spaC (adhesina) se expresan al mismo tiempo con valores superiores en cepas obtenidas de abscesos en comparación con cepas cultivadas *in vitro*, demostrando la importancia de estas moléculas para la virulencia de la bacteria (Correa *et al.*, 2018).

Otras proteínas identificadas en la red de interacción de PLDr 2J-L fueron las involucradas en la adquisición de hierro, Fag A, Fag B, Fag C, y Fag D, con interacción de tipo mención en textos científicos, y para el caso de la red de interacción de CP40r 2J-L la proteína potC, permeasa transportadora de hierro con interacción de tipo co-ocurrencia filogenética. Se ha demostrado la presencia de los genes del operón Fag ABCD así como el gen *pld* (co-ocurrencia filogenética) identificados mediante PCR Multiplex en aislados de *C. pseudotuberculosis ovis* obtenidos de cabras y ovejas del Estado de Jalisco, incluyendo el aislado 2J-L (Varela *et al.*, 2018). La expresión de muchos factores de virulencia está regulada por el suministro de hierro en el ambiente y la restricción de este nutriente provoca tasas de crecimiento bajas en patógenos bacterianos, lo que también puede estimular inducción de mayor daño tisular (Neumann *et al.*, 2017). Se ha visto que la baja disponibilidad de hierro produce en cepas de *Corynebacterium diphtheriae* mayor interacción con eritrocitos humanos y células HEp-2. Los ensayos de inhibición sugirieron la participación de la combinación de proteínas no fimbriales 67-72p en la hemaglutinación de *C. diphtheriae* cultivados en condiciones de concentraciones bajas de hierro. Los análisis de unión de lectina demostraron una reducción en el número de residuos de ácido siálico y un aumento en los residuos de d-manosa y d-galactosa en la superficie celular. Por lo tanto, el hierro ejerce un papel regulador en las propiedades de adherencia del patógeno y su baja disponibilidad modula la expresión de las fracciones de carbohidratos de la superficie celular (Moreira *et al.*, 2003). Por otra parte, Ibraim y colaboradores analizaron el transcriptoma de las cepas T1 (salvaje) y Cp13 (mutante) de *C. pseudotuberculosis* en condiciones de restricción de hierro y los resultados mostraron una expresión diferencial en 77 y 59 genes, respectivamente. Veinticinco de estos genes tenían patrones de expresión similares en ambas cepas, incluyendo genes regulados positivamente, homólogos al locus hmu de captación de hemina y dos operones distintos que codifican proteínas estructuralmente similares a la hemina. Las proteínas de superficie de unión a Hemoglobina se expresaron en niveles más altos en el mutante Cp13 que en la cepa T1 de tipo salvaje. Dentro de los factores regulados positivamente se identificaron los conocidos como hierro/DtxR. El análisis demostró que bajo condiciones de restricción de hierro *C. pseudotuberculosis* activa mecanismos para la utilización intracelular del hierro y la regulación positiva de los sistemas de adquisición de hemina (Ibraim *et al.*, 2019).

También la proteína PLDr 2J-L estableció relación con pepD, molécula clasificada dentro de la red como proteasa de serina. Estudios previos identificaron a la proteína CP40 como proteasa de serina (Walker *et al.*, 1995), por lo que la interacción con pepD podría hacer referencia a la proteína CP40. El nodo de pepD según la escala de colores se asocia con

procesos metabólicos celulares, verde con expresión de genes, azul con regulación del metabolismo celular y rojo con regulación de actividad endopeptidasa, por lo que su relación con la proteína PLDr 2J-L establece una red dinámica que involucra diversas funciones vitales para la bacteria. Otra de las proteínas indicadas en la red de interacción de PLDr 2J-L fue *rpoB* (Subunidad β ARN polimerasa) cuyo gen se utiliza en la identificación de aislados de la bacteria mediante PCR. La amplificación de un segmento de 452 pb del gen *rpoB* permite diferenciar la bacteria hasta el nivel de especie, siendo el porcentaje de similitud más elevado entre especies de 95.9% lo que garantiza la correcta identificación por esta técnica (Khamis *et al.*, 2005). Otra de las proteínas identificadas en la red fue *plrD* (L14 de unión a la subunidad 50S ARNr), la cual ha sido evaluada en formulaciones vacunales como rCP01850, proteína obtenida vía recombinante. La combinación de rCP01850 con PLDr confirió protección al 50% de los ratones desafiados con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, con un aumento significativo en los niveles de anticuerpos IgG2 (Silva *et al.*, 2018). También en ambas redes de interacción se identificaron proteínas involucradas en la adhesión y colonización de la bacteria. *C. pseudotuberculosis* es intracelular facultativa y presenta la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos, lo cual le permite propagarse y llegar al nódulo linfático más cercano al sitio de ingreso de la bacteria, y una vez ahí se produce la formación de abscesos. Las proteínas PLD y CP40 constituyen factores de virulencia que mostraron estar relacionadas en interacciones de tipo funcional y metabólico con otras proteínas de importancia para la patogenicidad y supervivencia de la bacteria. El uso de ambas como antígenos vacunales representa una estrategia valiosa para la activación de la respuesta inmune para combatir funciones bacterianas vitales.

IX.1.2 Predicción de epítomos de Linfocitos T de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L presentados en el contexto del MHC-I y MHC-II.

La inmunoinformática es una de las estrategias más utilizadas en la búsqueda de nuevas moléculas candidatas para el desarrollo de vacunas. El análisis computacional constituye una herramienta alternativa que permite caracterizar los antígenos potenciales evitando el cultivo del microorganismo patógeno, el uso de animales de experimentación en las primeras etapas del diseño, así como ahorros significativos en tiempo y costos de la investigación (Dalsass *et al.*, 2019). Los programas de bioinformática permiten la predicción en base a diferentes características de los antígenos como la estructura, adherencia, fusión, antigenicidad, unión a receptores del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I y II, secuencias de unión a proteasomas, así como activadores de linfocitos B y T (De Groot *et al.*, 2020). Los epítomos de linfocitos T son regiones específicas de una proteína que pueden activar dichas células a través de la interacción de los TCR en el contexto de la presentación de antígenos mediada por las moléculas de MHC-I o MHC-II, y su identificación se considera de gran interés en la caracterización de moléculas candidatas para el diseño de vacunas (Sanchez-Trincado *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2020). La respuesta inmune celular es necesaria para la activación de los linfocitos T y la resolución de infecciones bacterianas intracelulares como

C. pseudotuberculosis biovar *ovis*, bacteria que tiene la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos, por lo que la respuesta inmune celular es crucial para lograr una vacuna efectiva (Stefanska *et al.*, 2010).

El uso de la interface web IEDB que utiliza NetMHCpan como método de predicción (Reynisson *et al.*, 2020) permitió la estimación de epítomos de Linf T de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. IEDB presenta una base de datos que incluye una gran variedad de alelos MHC de diferentes organismos como: humanos, chimpancés, macacos, gorilas, vacas, cerdos y ratones, sin embargo aún es limitada para la predicción de otras especies como ovejas, caprinos o equinos, debido a un conjunto de datos de entrenamiento insuficiente. Dado que el modelo murino se ha utilizado para la evaluación experimental de vacunas contra la LAC, permitiendo el desarrollo de la enfermedad con la formación de abscesos y la infección sistémica (de Pihno *et al.*, 2021), el mismo fue utilizado para el análisis de epítomos de células T de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

Los genes que codifican el MHC han sido identificados en los cromosomas 6 y 17 para el humano y el ratón, respectivamente. Estos son denominados como complejo HLA en humano (HLA-A, HLA-B, HLA-C para complejo I y HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP para complejo II) y H-2 para ratón (H-2-K, H-2-D, H-2-L, H-2-Qa para complejo I y H-2-IA, H-2-IE para complejo II). Los genes que codifican para el MHC en ovejas se localizan en el cromosoma 20, inicialmente llamado OLA con base en la nomenclatura HLA para humanos, pero posteriormente se estableció el nombre Ovar-MHC (Dukkipati *et al.*, 2006a).

En ovejas, la región de clase I está poco caracterizada, y se ha propuesto que existen cuatro loci: OLA-A, B, C y D. Los genes MHC de clase I ovinos son similares a los genes de clase I bovinos (Dukkipati *et al.*, 2006b); sin embargo, utilizamos los datos murinos ya que fue el modelo experimental empleado *in vivo* para la evaluación de los formulados vacunales y la reproducción de la LAC. La estructura general del MHC se conserva entre las especies de mamíferos, incluidas tres regiones principales con diferentes papeles funcionales (Kelley *et al.*, 2005).

Los genes de clase I son miembros de la familia de inmunoglobulinas que participan en la presentación de péptidos (8 a 12 residuos de aminoácidos, mayoritariamente de 9 aa) derivados predominantemente de proteínas intracelulares y parásitos, a las células T citotóxicas CD8⁺, y al igual que las moléculas de clase I de otras especies, se encontró que las de ovinos se distribuyen en linfocitos y tejidos no linfoides (Subramaniam *et al.*, 2015).

Los genes de clase II también son miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulina que están especializados funcionalmente para la unión de péptidos (13 a 30 residuos de aminoácidos, mayoritariamente de 15 aa) antigénicos derivados de proteínas extracelulares, presentes en la membrana plasmática, en orgánulos de las vías endocíticas o secretoras, presentados al TCR de las células T CD4⁺.

El complejo HLA incluye cinco conjuntos de los genes clásicos DP, DM, DO, DQ y DR y genes no clásicos como LMP, TAP y TAPBP. Dentro de cada conjunto de genes clásicos, los genes para la cadena α se designan A, mientras que los genes para la cadena β se denominan B. Los genes de las cadenas α y β en cada conjunto están ubicados cerca uno del otro y se asemejan a una unidad de duplicación de dos genes, con la excepción de los genes DOA y DOB, que están separados entre sí (Hake *et al.*, 2003). En los rumiantes, la región de clase II está mejor caracterizada, y se divide en dos subregiones distintas, "a" y "b", con evidencia de un DRA y cuatro DRB (uno codificante y tres no codificantes), un DQA1, dos DQA2 y uno de cada uno de los genes DQB1, DQB2, DNA, DOB, DYA, DYB, DMA y DMB. En ovejas existen homólogos de los genes DQ y DR, pero probablemente no de DP (Dukkipati *et al.*, 2006). El alto grado de polimorfismo en los genes que codifican al MHC impacta en la respuesta inmune individual durante la vacunación, por esta razón, se evaluaron diferentes alelos en la presentación de los epítomos de células T.

Los resultados del trabajo revelaron péptidos en ambas proteínas que pueden interactuar con una amplia gama de alelos de MHC clase I (H-2-Kb, H-2-Kk, H-2-Kd, H-2-Db, H-2-Qa1) y MHC clase II (H-2-IAb, H-2-IAd). Las secuencias de la proteína PLDr 2J-L con mayor potencial para activar células T CD8⁺ en el contexto de diferentes alelos del MHC-I fueron: posición 56 VAIGANAL 63 (alelos H-2-Kb y H-2-Db), 139 LEPAGVRV 146 (alelos H-2-Kd, H-2-KK y H-2-Qa1) y secuencia 202 GYYNI 206 (alelos H-2-Kd, H-2 Kb y H-2-Kk). Para la proteína CP40r 2J-L, las secuencias que fueron reconocidas por más de un tipo de alelos fueron: secuencias 137 RTVGAQL 143 (alelos H-2-Qa1 y H-2-Kb) y 205 KIMGAFSEL 213 (alelos H-2-Kb y H-2-Qa1). Sin embargo, la predicción no mostró en ninguna de las proteínas epítomos con capacidad de presentación por los alelos del MHC clase I H-2-Dd, H-2-Ld y H-2-Qa2, por lo que sería conveniente evaluar otros factores de virulencia de la bacteria que cubran la presentación de antígenos a estas variedades de alelos del MHC. La secuencia 24'VHNPASTAN'38 de PLDr 2J-L fue identificada como epitopo de células T para la presentación de antígenos por más de un alelo MHC-II, así como también en estudios previos esta secuencia fue identificada formando parte de epitopos de células B, predichos por los programas Bepipred, Emini Surface scale, Antigenicity scale y Ellipro (Rodríguez-Domínguez, 2020). La presentación de antígenos a través del MHC- II evidenció 6 epítomos en la proteína CP40r 2J-L con representación de 2 tipos de alelos (H2-IAb y H2-IAd).

Recientemente se evaluaron en un modelo murino formulaciones de seis péptidos de la proteína CP40, previamente identificados como posibles epitopos de células B (Droppa Almeida *et al.*, 2018; Rodríguez –Domínguez *et al.*, 2022). Los valores de protección fueron variados; por ejemplo, los péptidos 4 y 6 proporcionaron un 10% de protección, mientras que el péptido 5 un 20%. Además, los péptidos 1 y 2 proporcionaron un 30% y un 40%, respectivamente, siendo los valores de protección más elevados. Aunque todos los grupos fueron afectados durante el desafío con una cepa de virulencia, también mostraron la

producción de anticuerpos IgG totales y citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ y TNF- α), lo que indica una posible activación de la respuesta de tipo Th1 (Droppa-Almeida *et al.*, 2021).

El estudio de epítomos de células T también se ha realizado *in silico* con otras proteínas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* donde SpaC, PknG y NanH presentaron mayor potencial vacunal que Sod C. Se predijo un total de 136 epítomos de células B y T a partir de los cuatro factores de virulencia. También se realizó un análisis de conglomerados para evaluar el grado de redundancia entre las secuencias de los epítomos predichos; se formaron 57 conglomerados, la mayoría de ellos (34) conglomerados individuales. Dos conglomerados de PknG y uno de SpaC agruparon epítomos de células B y T (MHC I y II). Se determinó que los epítomos pueden estimular potencialmente una respuesta inmunitaria completa (humoral y celular) contra *C. pseudotuberculosis*. Otros conglomerados de NanH agruparon epítomos de LinF B y LinF T (MHC I o II) (Santana-Jorge *et al.*, 2016). También se han analizado epítomos inmunodominantes de la proteína CP40, con la obtención de 6 secuencias, de 10 a 16 residuos de aminoácidos, con potencial para el desarrollo de vacunas. Posteriormente, se realizó la predicción de la unión de la proteína CP40 y el receptor TLR2, presentándose interacción con este receptor, el cual juega un papel importante en la activación de la respuesta inmune (Droppa-Almeida *et al.*, 2018).

Esta estrategia de vacunología inversa para la caracterización de antígenos vacunales también ha sido aplicada en la predicción de epítomos de *Mycobacterium tuberculosis*, donde se analizaron 20 610 péptidos derivados del estudio del proteoma de 21 pacientes en tratamiento de tuberculosis activa. Los resultados mostraron 137 epítomos capaces de activar LinF T e IFN γ . De estos, el 16 % se deriva de antígenos de la pared celular y de procesos celulares. También se identificó entre los participantes del estudio un reconocimiento diferencial de antígenos, incluidos los antígenos candidatos a la vacuna contra la tuberculosis (Panda *et al.*, 2024).

Otro trabajo donde se analizaron 166 individuos con infección por *M. tuberculosis* que progresaron a tuberculosis (n = 48) o infección controlada (n = 118), permitió la identificación de 24 grupos de células T con secuencias TCR- β similares, que se asociaron con el control de la infección (n = 17), y otras que se asociaron con la progresión a la enfermedad (n = 7). Utilizando un cribado de antígenos de *M. tuberculosis* en todo el genoma, se identificaron péptidos diana de los grupos de similitud de células T. Los autores proponen que los antígenos reconocidos por grupos de similitud de células T asociados con el control de la infección pueden considerarse objetivos de alta prioridad para el desarrollo de vacunas (Musvosvi *et al.*, 2023).

Los resultados mostraron que PLDr 2J-L y CP40r 2J-L son proteínas multiepitópicas con potencial como candidatas para el desarrollo de vacunas, ambas con capacidad de activación de las células T a través de la presentación de antígenos tanto en el contexto MHC- I (células T CD8⁺) como el MHC- II (células T CD4⁺), lo que evidencia el potencial inmunogénico de estas moléculas.

IX.1.3 Simulación de la respuesta inmune humoral y celular ante la aplicación de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como formulados vacunal.

El programa C-ImmSim presenta una colección de modelos que permiten la simulación de la respuesta inmune humoral y celular, basados en las interacciones entre diferentes poblaciones celulares e interacciones entre las células y moléculas. En particular, las siguientes poblaciones celulares se incluyen en la simulación del programa: Linfocito B (LB), Linfocito T colaborador (Th) con posibilidad de distinguir entre Th1, Th2 y Th0, Linfocitos T killer (citotóxico) (Tk), macrófago (MA), célula epitelial (como célula diana genérica) (EP), Linfocito B plasmático (PLB); y las moléculas: antígeno (bacteria o virus genérico) (Ag), anticuerpo (Ab) con posibilidad de distinguir entre IgM, IgG e IgE, y complejos inmunes o unión Ab-Ag (IC). Algunas señales intracelulares están representadas explícitamente como, por ejemplo, interferón- γ (IFN), interleucina-4 (IL-4), interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12), histamina (HIS), y una señal de peligro genérica (D), mientras que otras citocinas solo se tienen en cuenta "implícitamente" en las reglas de interacción del programa predictivo de simulación. Las interacciones se clasifican como específicas del tipo Anticuerpo-Antígeno; LinF B-Antígeno; LinF T (NK)-APC; LinF Th-APC; LinF T (NK)-células infectadas; LinF B- LinF Th y no específicas entre células APC-Antígeno y células Epiteliales-antígeno. Para las interacciones específicas se considera la participación de los elementos: TCR; BCR; MHC-I; MHC-II; Anticuerpos y Antígeno (Calcagno y Gherzi, 2002). La principal diferencia entre las entidades celulares y moleculares radica en que las células pueden clasificarse sobre la base de un atributo de estado. El programa considera como estado de una célula la etiqueta artificial introducida por la representación lógica del comportamiento de las células. El modelo representa un milímetro cúbico de un nódulo linfático o un mililitro de sangre periférica. Cada paso en la escala de las X corresponde con 8 horas de tiempo real y se asume que las células y las moléculas que residen en el mismo sitio de la red tienen la oportunidad de interactuar entre sí. Las reglas que implementan estas reacciones se ejecutan en un orden aleatorio, en cada paso de tiempo para evitar cualquier comportamiento sistemático. El núcleo de toda la simulación está originado por la red de interacciones representadas por reglas de interacción entre entidades celulares y células-moléculas. En términos inmunológicos se pueden agrupar las interacciones de la siguiente manera: fagocitosis y activación inmunitaria, fagocitosis, infección y citotoxicidad. La fagocitosis comprende las reglas para la actividad de las células que procesan antígenos. La activación inmunitaria codifica la actividad de los linfocitos T auxiliares Th que reconocen el complejo MHC-péptido y activan otras poblaciones celulares, mediante la liberación de citocina. La opsonización se refiere a la inactivación del antígeno mediante la unión de anticuerpos. La citotoxicidad es la causa de la muerte de las células infectadas por el virus por parte de las células citotóxicas. Para completar esta breve descripción del modelo, el mecanismo de la hematopoyesis tiene en cuenta la actividad generadora de células madre pluripotentes en la médula ósea, que se realiza añadiendo

aleatoriamente células recién formadas periódicamente (se implementa un proceso de reversión a la media para asegurar que, en ausencia de estímulo antigénico, el número de células se mantenga en un estado estable) (Castiglione y Bernaschi, 2004). La versatilidad de este modelo permite la simulación del experimento para ajustar el diseño antes de una evaluación real *in vitro* o *in vivo*. Esta herramienta bioinformática ha sido de utilidad para el análisis de vacunología inversa en la búsqueda de candidatos vacunales contra patógenos como: Herpes virus -1, (Roy *et al.*, 2024); *Yersinia pestis* (Sarfraz *et al.*, 2024); *Aeromonas hydrophila* (Alawam y Alwethaynani, 2024); *Escherichia fergusonii* (Almana, 2023); *Escherichia coli* uropatogénica (Ishaq *et al.*, 2023) y SARS-CoV- 2 (Devi y Chaitanya., 2020).

Los resultados de la simulación mostraron la capacidad de las proteínas recombinantes de inducir una respuesta humoral con un aumento en la población de Linf B y la generación de respuesta adaptativa con la producción de IgG1, principalmente. Además de la activación directa de las células B por el propio antígeno, una serie de señales secundarias influirán en la diferenciación de las células B, incluido el reconocimiento por parte de receptores tipo Toll y las citocinas producidas por otros linfocitos y células presentadoras de antígenos. Las cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) están altamente conservadas, y difieren en la región bisagra, que forma un conector flexible entre los brazos Fab y la región Fc. La longitud y flexibilidad de la región bisagra varía ampliamente entre las subclases, en IgG1 está formada por 15 aminoácidos y es muy flexible, mientras que en IgG2 presenta 12 aminoácidos y es rígida debido a una hélice de poliprolina estabilizada por 4 puentes de disulfuro entre las cadenas pesadas. La flexibilidad relativa de los brazos Fab con respecto a Fc difiere entre las subclases de la siguiente manera: IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2, lo que también refleja la unión relativa de estas subclases a FcγR y a C1q (Carrasco *et al.*, 2001). Como resultado, las subclases tienen diferentes funciones efectoras, tanto en términos de activación de células que expresan receptores Fc de IgG (FcγR), lo que resulta en fagocitosis o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, como en la activación del complemento vía unión a las proteínas C1q.

Los antígenos proteicos solubles y proteínas de membrana activan la producción de la subclase IgG1, acompañado de niveles más bajos de las otras subclases, principalmente IgG3 y IgG4. La IgG1 es la subclase más abundante y se ha visto que la deficiencia de esta puede resultar en una disminución de los niveles totales de IgG (hipogammaglobulinemia) (Jefferis *et al.*, 1990). También los anticuerpos vinculan el sistema inmunitario adaptativo con los mecanismos efectoras del sistema inmunitario innato. La activación del complemento se inicia a través de la unión de C1q, lo que conduce a la deposición de C3b para opsonizar el antígeno, pero también a la formación del complejo de ataque de membrana, C5-C9, que causa la interrupción de la membrana bilípida objetivo (Sarma, 2011). Se ha identificado que las subclases IgG1 e IgG3 pueden activar de manera eficiente esta ruta clásica del complemento, mientras que IgG2 lo hace en menor frecuencia. Por otra parte, los clones de

Linf T CD4⁺ pueden clasificarse en dos subconjuntos que se distinguen por las citocinas que producen tras la estimulación con el antígeno y las subclases de anticuerpos cuya producción se ve favorecida. Los subconjuntos Th1 y Th2 producen principalmente las citocinas IFN-gamma e IL-4, y favorecen la producción de IgG2 e IgG1, respectivamente (Bretscher, 2014).

En los resultados encontramos discrepancias en cuanto a la subclase de anticuerpos que se ve favorecida (IgG1) lo cual sugiere que el perfil Th2 debería ser superior; sin embargo, en la predicción de las poblaciones celulares de LinF T CD4⁺ se presenta en mayor proporción el subconjunto Th1. Estos resultados podrían explicarse debido a que el programa evalúa la probabilidad de unión (interacción) entre las entidades basado en diferentes características: para la producción de inmunoglobulinas toma en cuenta la participación de LinF B-Antígeno y para la simulación de subpoblaciones Th1 o Th2 involucra a los LinF Th- células APC (Calcagno y Gherzi, 2002). Por otra parte la evidencia experimental de la producción de inmunoglobulinas inducidas por formulados vacunales con PLDr y CP40r evidencia que los títulos de IgG1 o IgG2 se favorecen en función de los antígenos empleados, por separados o en combinación con otras proteínas, subunidades bacterianas y adyuvantes, originando resultados variados. La formulación de PLDr en conjunto con la proteína L14 de unión a la subunidad 50S ARNr (rCP01850) de *C. pseudotuberculosis*, aplicadas en un modelo murino mostraron niveles significativos de anticuerpos IgG2, indicativo de un perfil de células T CD4⁺ Th1 (Silva *et al.*, 2018). Por otra parte, la inmunización de ratones BALB/c con CP40r (1ra dosis) seguido de la aplicación de una cepa atenuada CP09 (2da dosis) mostró a los 30 días post inmunización un aumento significativo en el título de anticuerpos de la subclase IgG1. Sin embargo, en todos los grupos experimentales luego del desafío con una cepa virulenta se identificó un aumento significativo en los niveles de IgG2, siendo el valor máximo alcanzado por los animales inmunizados con CP40r (Silva *et al.*, 2014). En otro estudio los animales vacunados con CP40r / saponina mostraron valores elevados en los niveles completos de anticuerpos IgG anti-CP40r y de las subclases IgG2a, IgG2b e IgG3, con diferencia estadísticamente significativas con respecto al grupo control evaluado al día 60 después de la inmunización. Recientemente el uso de una proteína quimérica fusionada MBP:PLD:CP40 aplicada en ratones BALB/c indujo una respuesta principalmente de inmunoglobulinas IgG1, mientras que los animales vacunados con rPLD + rCP40 (25 µg /mL) no mostraron diferencias significativas en el título de Ab (Barral *et al.*, 2022).

La predicción en la presentación de antígenos por parte de los macrófagos y células dendríticas fue fundamentalmente por la acción de las moléculas MHC-II, las cuales participan en la activación de Linf T CD4⁺ y LinF B por encima de una respuesta de Linf T CD8⁺. El perfil de células Linf T CD4⁺, mostró que se ve favorecido el subconjunto Th1 ante el Th2. Las células TCD4⁺ activan otras células del sistema inmunológico, como las células B, las células T CD8⁺ y los macrófagos. En condiciones de infección crónica, en las que las células T CD8⁺ tardan varios meses o más en eliminar la infección, las células T CD4⁺ desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la actividad de las células T CD8⁺

(Matloubian *et al.*, 1994). Estudios experimentales han considerado que la inducción de una respuesta Th1 (células T CD4⁺) es relevante para la activación de las células T CD8⁺ en el contexto de la MHC-I, logrando así una respuesta eficiente contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Silva *et al.*, 2018; Leal *et al.*, 2018).

Los Linf T citotóxicos (LTc) de memoria no mostraron activación y las células efectoras presentaron una disminución en los valores en la medida que avanza el experimento simulado con el programa C-ImmSim. Las células LTc efectoras tienen la capacidad de reconocer y matar células infectadas con el patógeno, lo que constituye un componente importante de la inmunidad protectora. Sin embargo, se ha demostrado que durante las infecciones crónicas las células T pueden sufrir un deterioro funcional, que es una de las principales razones de la incapacidad del hospedero para eliminar el patógeno persistente. Las células T que se generan durante las primeras etapas de la infección pierden gradualmente su función durante el curso de la infección crónica. Este fenómeno de producción agotada de linfocitos T se ha caracterizado en ratones y humanos con infecciones crónicas establecidas por agentes virales (Rehermann *et al.*, 2005). Por estas razones, es esencial activar las células T de memoria. A pesar de algunas similitudes a nivel molecular, epigenético, metabólico y funcional entre las células T CD8⁺ efectoras y las células T CD8⁺ de memoria, estas últimas persisten durante largos períodos de tiempo y son capaces de proliferar después de volver a encontrarse con el antígeno (Martin *et al.*, 2018). Existe evidencia experimental que indica que las formulaciones con proteína CP40 recombinante son eficientes en brindar protección asociada con una respuesta celular Th1 en ausencia de un perfil Th2 (Silva *et al.*, 2014, Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

También se estimó la producción de citocinas, siendo los niveles de IL-2 e INF- γ superiores al resto de las moléculas analizadas, resultados que están en concordancia con lo obtenido por Silva y colaboradores, en el análisis de la aplicación de la proteína PLDr en ratones BALB/c donde se identificaron valores elevados de INF- γ y TNF- α estadísticamente significativos; mientras que la producción de IL-4 e IL-12 no fue detectada (Silva *et al.*, 2018). La inmunización de ratones BALB/c con la cepa *Mycobacterium bovis* BCG transformada con el plásmido pUS2000/*pld* para la producción de PLDr, seguido de una segunda dosis de aplicación de la proteína PLDr, mostro valores de INF- γ superiores (498pg/mL) en comparación con el resto de las formulaciones evaluadas (Leal *et al.*, 2018).

En otro estudio se evaluó la producción de quimiocinas (CCL-2, CCL-3, CCL-4 y CCL-5) y citocinas (IL-1 y TNF) en esplenocitos murinos estimulados con la infección por *C. pseudotuberculosis* cepa altamente patógena (VD57) y la cepa atenuada (T1), así como antígenos somáticos y secretados derivados de estas cepas. La cepa VD57 tuvo una mayor capacidad para estimular la producción de quimiocinas en comparación con la cepa T1, especialmente en las primeras etapas de estimulación, lo que puede tener un impacto en la formación de granulomas. El antígeno del lisado T1 fue capaz de estimular la mayoría de las

quimiocinas estudiadas en este trabajo en comparación con las otras fracciones antigénicas de ambas cepas. Estos resultados indican que *C. pseudotuberculosis* es un inductor de la producción de quimiocinas y que las cepas bacterianas difieren en su patrón de inducción, situación que puede estar relacionada con el comportamiento específico de cada cepa (Barral *et al.*, 2022b).

IX.2.1 Obtención de las proteínas recombinantes PLDr y CP40r derivadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L.

La tecnología del ADN recombinante presenta numerosas ventajas para el desarrollo de la investigación, la biotecnología y la producción industrial. Su aplicación para la producción de proteínas recombinantes u heterólogas, que se caracterizan por ser obtenidas en organismos diferentes al nativo como resultado de la manipulación genética, permite optimizar los bioprocesos para la obtención de crecimiento de alta densidad celular, control metabólico, concentraciones elevadas de las proteínas de interés y la conservación de sus propiedades nativas (González y Fillat, 2018).

La expresión y secreción de PLD y CP40 en el sistema nativo ha sido identificada a partir del análisis de anticuerpos anti-PLD y anti-CP40 en muestras de sueros obtenidos de una infección experimental. El ensayo de inmunoblot permitió la detección de anticuerpos dirigidos en un 88% al reconocimiento de proteínas de 30-31KDa (rango de peso molecular de PLD) y en un 75%-88% para proteínas de 38-41KDa (rango de peso molecular de CP40) (Paule *et al.*, 2004). El estudio del exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002 de origen brasileño, sometida a la reactivación mediante 2 procesos de infección en el modelo murino BALB/c, evidencio la expresión de ambas proteínas solamente en la cepa reactivada (Silva *et al.*, 2017). En este sentido el uso de sistemas recombinantes no solo favorece la expresión de las proteínas de interés en la cepa hospedera, sino que también ofrece seguridad en la producción a gran escala de estos antígenos que provienen de agentes patógenos como *C. pseudotuberculosis*, agente zoonótico que representa un riesgo para la salud humana (Trost *et al.*, 2010; Heggelund *et al.*, 2015).

La proteína PLD se obtuvo por primera vez vía recombinante utilizando el vector pUC12 en la cepa *E. coli* DH5 α y mediante ensayos de Southern blot fue identificada la secuencia del gen insertado en el plásmido. Posteriormente, se realizaron estudios de mutagénesis sitio específica para modificar a nivel genético la secuencia involucrada en el sitio activo de la proteína para la inactivación de su efecto toxico. En este trabajo la PLDr modificada se expresó en el sistema *E. coli* DH5 α y el plásmido pTZ18U, seguido de la identificación de la expresión mediante electroforesis en SDS-PAGE y Western blot. Por otra parte en diversos estudios se ha utilizado el plásmido pAE para la expresión en *E. coli* BL21 (DE3) y la

purificación mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos por cola de 6x His (Leal *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018).

Por su parte, la proteína CP40 también ha sido obtenida utilizando la tecnología de ADN recombinante. Walker y colaboradores emplearon el plásmido pBE12GEX2 y *E. coli* XL1-Blue para la obtención de CP40r a partir del sobrenadante del cultivo, representando el 15% de las proteínas totales (Walker *et al.*, 1994). El sistema de expresión conformado por el plásmido pAE y la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) también se utilizó para la obtención de CP40r con 1mM de IPTG como inductor de la expresión. En este trabajo la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad, utilizando la columna HisTrapTM HP (GE Healthcare, USA) (Silva *et al.*, 2014). A su vez, el sistema de expresión anteriormente citado fue utilizado por el grupo de investigación de Droppa-Almeida y colaboradores para la obtención de CP40, confirmándose la producción de la proteína mediante Western blot con el marcaje de Ab monoclonal anti-His conjugado con peroxidasa (Sigma, USA). La purificación se realizó por cromatografía de afinidad en una columna de níquel sepharose HisTrapTM (GE) y el grado de pureza se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% (Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

Escherichia coli constituye un hospedero con numerosas ventajas para la expresión de proteínas recombinantes. Su crecimiento es rápido y a partir de medios de cultivos sencillos y económicos, existe una gran variedad de plásmidos para la construcción genética, su fisiología y genoma se encuentran caracterizados; y en consecuencia se han desarrollado muchas herramientas de ingeniería cromosómica que facilitan la clonación de genes y su expresión. La cepa *E. coli* BL21 (DE3) se encuentra modificada genéticamente para evitar la producción de las enzimas Lon y Omp-t, las cuales presenta actividad proteasa y podrían degradar las proteína de interés. También produce bajos niveles de metabolitos secundarios y presenta el profago λ DE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor lacUV5, inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El IPTG induce la expresión de la T7 ARN polimerasa y consecuentemente la del gen de interés, ya que este inductor remueve el represor lac del operador lacO. El gen que codifica el represor lac está presente en el cromosoma bacteriano, con lo que se garantizan altas concentraciones del represor en la célula. Esto hace que en condiciones normales la enzima no se exprese o se exprese muy poco. Las proteínas expresadas por vía recombinante pueden ser dirigidas hacia el citoplasma, periplasma o medio extracelular (Studier *et al.*, 2005; Angius *et al.*, 2018).

La producción de la proteína recombinante dirigida hacia el medio extracelular facilita su obtención y purificación, sin embargo en ocasiones la elevada concentración de proteína recombinante forma agregados insolubles en el citoplasma denominados cuerpos de inclusión. Las proteínas solubles en el citoplasma pueden purificarse directamente aplicando

métodos cromatográficos, mientras que las proteínas en cuerpos de inclusión se deben tratar con compuestos caotrópicos como la urea, proceso con lleva a la desnaturalización de la proteína. Para la purificación de proteínas se pueden utilizar marcadores de afinidad, como una cola (Tag) de 6 Histidinas que permitan la selección de la proteína de interés mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos (IMAC). Estos métodos favorecen la recuperación de la proteína recombinante en grandes concentraciones y con un elevado grado de pureza. Otro de los aspectos favorables del sistema de expresión utilizado en el presente trabajo es la capacidad de autoinducción con lactosa, para un escalado de la producción aplicando fermentación en dos etapas. En estos sistemas la producción solo se activa una vez que se obtiene suficiente masa celular garantizando una mayor producción de proteínas (De Baets *et al.*, 2024).

En el trabajo el sistema de expresión utilizado permitió la obtención de ambas proteínas, sin embargo, la producción de PLDr 2J-L fue superior que la de CP40r 2J-L. Podemos citar algunos de los problemas asociados con una baja tasa de expresión de proteínas recombinantes: la formación de cuerpos de inclusión (Baig *et al.*, 2014), la carga metabólica (Bienick *et al.*, 2014), la translocación ineficiente (Baneyx y Mujacic 2004) y el crecimiento de segregantes (Beisel y Afroz 2016). Dado que cada proteína es diferente, las estrategias de expresión y purificación deben definirse para cada caso particular. Para mejorar el rendimiento de la obtención de CP40r 2J-L algunos de los parámetros a optimizar incluyen: la construcción de la proteína, como el uso de una proteína de fusión, la elección de una etiqueta/fusión His u otra unida al N-terminal o C-terminal; aquellos relacionados con la etapa de expresión, como la concentración y selección del agente inductor, la temperatura de expresión, selección del sistema hospedero y, finalmente la elección del medio y las condiciones de cultivo considerándose estos los aspectos tecnológicos fundamentales para la optimización del bioproceso.

La cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3), es la bacteria más utilizada en el sistema de expresión procariota ya que codifica a la ARN polimerasa T7 (ARN P T7) la cual se encuentra bajo el control del potente promotor lacUV5 (PlacUV5), que es más permeable y activo que el promotor lac de tipo salvaje (PlacWT) en determinadas condiciones de crecimiento. Se ha visto que para determinadas proteínas (con toxicidad, lábiles) esta característica no es ventajosa ya que por un lado, la expresión permeable de la ARN P T7 conduce a una rápida producción de proteínas diana en un período no inductor y esto absorbe recursos del crecimiento celular y además puede conducir a la pérdida del plásmido de expresión o a la aparición de mutaciones en el gen expresado. Como alternativa se propone el uso de cepas variantes derivadas de BL21 (DE3) con expresión rigurosa de ARN polimerasa T7, con promotores como arabinosa (ParaBAD), promotor de ramnosa (PrhaBAD) y el promotor de tetraciclina (Ptet), con el fin de optimizar la producción de proteína recombinante regulando el nivel de transcripción y el nivel de fuga de ARN polimerasa T7 (Du *et al.*, 2021).

El ajuste de la transcripción es una estrategia prometedora para superar los desafíos asociados con una tasa de expresión ineficiente. Al ajustar la tasa de expresión se pueden lograr títulos de producto más altos y procesos de producción más rentables al permitir la estabilidad a largo plazo del cultivo y una calidad constante del producto. Striedner y colaboradores informaron sobre la transcripción de la superóxido dismutasa humana utilizando la polimerasa T7 bajo el control de lacUV5 en la cepa de *E. coli* K12 HMS174 (DE3) (operón lac intacto) con IPTG (Striedner *et al.*, 2003). Fermentaciones suplementadas exponencialmente con el sustrato inductor IPTG en función de la biomasa esperada, manteniendo una proporción constante de IPTG a biomasa, mostró mejoras en la productividad del cultivo durante un período más largo en comparación con un proceso con adición convencional de inductor en un punto, y observaron un aumento de 3,5 veces del título general del producto.

Recientemente Eastwood y colaboradores, desarrollaron un sistema para exportar proteínas recombinantes en vesículas unidas a la membrana de *E. coli*. En la construcción genética se adiciona una etiqueta Tag, para la producción de un péptido de 38 residuos amino-terminales de la hélice alfa 3 de α Syn, suficientes para provocar la formación y liberación de vesículas unidas a la membrana extracelular marcadas con la proteína OmpA. Este polipéptido derivado de α Syn, denominado péptido nucleador de vesículas, interactúa con vesículas compuestas de lípidos de membrana de *E. coli* reconstituidos y posteriormente estabiliza su estructura de hélice alfa 4. Permite la producción de alto rendimiento de proteínas funcionales dentro de paquetes de vesículas que simplifican la purificación y el almacenamiento a largo plazo. Este proceso ocurre sin afectar el crecimiento celular y por lo tanto impulsa la producción a gran escala de vesículas, apoyando el aislamiento de las proteínas recombinantes, lo que proporciona un ahorro significativo tanto de tiempo como de recursos. Este enfoque favorece la producción de proteínas insolubles, tóxicas y desafiantes a partir de bacterias (Eastwood *et al.*, 2023).

IX.2.2 Determinación de la dosis letal de la vacuna de subunidades PLDr 2J-L y CP40r 2J-L en el modelo murino.

La evaluación de la dosis letal (DL₅₀ y DL₁₀₀) de la vacuna de subunidades PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se realizó con el objetivo de identificar efectos adversos ocasionados por la proteína PLD obtenida vía recombinante, producto de la conservación de la actividad biológica como toxina, así como el uso de saponina como adyuvante. En el diseño del experimento se consideró el bienestar animal, con la implementación de la regla de las 3 R propuestas por Russell y Burch en 1959 para Reducir o disminuir el número de animales utilizados, Refinar o perfeccionar las técnicas para la evaluación del supuesto de la experimentación y Reemplazar o sustituir el uso animal siempre y cuando sea posible (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research,

2022). La evaluación de la dosis letal (DL_{50} o DL_{100}) se realizó siguiendo el método alternativo de Dosis Fijas (Stokes, 2002) cuyo objetivo principal es reducir el número de animales empleados, minimizar el sufrimiento de éstos y optimizar la cantidad de información extraída de la experiencia. El método se basa en la evaluación de dosis prefijadas para determinar la toxicidad de una sustancia según el Sistema Global Armonizado (SGA). El rango de dosis (50 µg) y la vía de inoculación (subcutánea) o exposición se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados alcanzados en estudios previos donde estas condiciones y moléculas (PLD y CP40) han sido utilizadas como antígenos para vacunas, confiriendo protección ante el desafío con cepas virulentas de *C. pseudotuberculosis* (Droppa-Almeida *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018).

En el trabajo se calculó la dosis de PLDr 2J-L que produjo la muerte del 50% de los animales ($LD_{50} = 36.11\mu\text{g}$) y el 100% ($DL_{100} = 60.8\mu\text{g}$). Los valores de LD_{50} obtenidos son menores en comparación con los resultados presentados por Muckle y colaboradores en la evaluación de la toxicidad de diferentes fracciones de PLD purificada a partir de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* donde los valores de DL_{50} oscilaron entre 20µg y 12µg, este último valor alcanzado por la fracción de mayor toxicidad (Muckle *et al.*, 1986). En los grupos experimentales donde se utilizó la proteína PLDr 2J-L (50µg) sin inactivar + Saponina (7.5µg) o combinada con CP40r 2J-L (50µg) se comprobó la conservación de la actividad biológica como toxina, ya que se registraron efectos tóxicos locales y sistémicos como la formación de fistula, pérdida de pelo y absceso en el sitio de inoculación, aumento de tamaño en el bazo e hígado, hemorragias, necrosis, así como letalidad en 9 de 10 animales por grupo. Los efectos tóxicos locales corresponden con alteraciones en el sitio donde primero se puso en contacto la toxina con el organismo, en este caso la piel del sitio de inoculación. Por otro lado, los efectos sistémicos requieren que la toxina sea absorbida y distribuida en el organismo, ocasionando daños en sitios distantes al de ingreso de la molécula, donde provoca los efectos nocivos. La toxicidad sistémica de PLDr 2J-L fue responsable de daño en más de un órgano, como el hígado, los riñones, los pulmones y la piel. Los resultados están en concordancia con evaluaciones previas donde la actividad de la exotoxina PLD producida por cuatro cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* fue evaluada en función de su letalidad en ratones BALB/c. En ese trabajo previo también se determinó *in vitro* la actividad hemolítica, el efecto inhibidor de la hemolisina estafilocócica y su actividad en un ensayo de ELISA. Las exotoxinas con un título hemolítico mayor o igual a 1 en 256 y de mayor efecto inhibidor (1 en 64) sobre la hemolisina estafilocócica causaron la muerte de todos los ratones en el experimento. La prueba hemolítica y la inhibición de la hemolisina estafilocócica estuvieron correlacionadas ($p < 0,001$) con la toxicidad de PLD en ratones. No se observó ninguna correlación significativa entre la prueba ELISA y la toxicidad relativa de las exotoxinas (Sutherland *et al.*, 1989). Para la toxina diftérica se ha determinado que la dosis letal en humanos es de 0.1 µg /kg de peso corporal, y que produce necrosis del corazón y el hígado. Además, se ha descubierto que la sensibilidad y la resistencia de las distintas especies

animales a la toxina diftérica varían, siendo el hombre, los perros, los conejos, los monos y los conejillos de indias especies susceptibles, mientras que las ratas y los ratones son relativamente resistentes. Los ratones pueden soportar 100 veces la dosis de la toxina que es letal para los conejillos de indias, y los humanos son cinco veces más sensibles a los efectos mortales de la toxina que los conejillos de indias (Prygiel *et al.*, 2024). La inoculación de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, la suspensión del sobrenadante del cultivo, así como la exotoxina fraccionada con sulfato de amonio o preparaciones purificadas mediante cromatografía se evaluaron en pequeños rumiantes (n = 13) causando la muerte en un periodo de 48 horas. Los cambios característicos observados en los animales que vivieron 2 horas después de la inoculación incluyeron hemorragia y edema en el sitio de la inyección, anemia hemolítica grave y hemoglobinuria, líquido rojo oscuro en las cavidades corporales, edema pulmonar e ictericia. La preparación de exotoxina cruda causó un síndrome de choque agudo en 2 corderos que murieron dentro de los 15 minutos posteriores a la inoculación. Las respuestas clínicas y patológicas de los animales inoculados con sobrenadante de cultivo y toxina purificada fueron similares (Hsu *et al.*, 1985). Aunque la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* indujo una anemia hemolítica en los animales experimentales, no provocó la lisis *in vitro* de eritrocitos ovinos, caprinos o bovinos, a menos que hubieran sido sensibilizados con filtrado de *Rhodococcus sp.* Como efectos adversos se consideran cambios morfológicos, fisiológicos o de alteraciones en el desarrollo y crecimiento, lo cual disminuye la supervivencia o funcionalidad del animal. El efecto de PLD se considera tóxico debido a que provoca una respuesta nociva que causa la muerte. Su grado de toxicidad depende de las características químicas y físicas de la molécula, el sitio de exposición, la ruta de metabolización y la sensibilidad del sistema biológico.

Las características químicas y físicas de PLDr 2J-L fueron analizadas en un estudio previo donde se demostró que el gen *pld* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislado 2J-L presenta un porcentaje de similitud de 99.91 % con relación a las cepas de origen mexicano MEX25 (CP013697.1) y MEX29 (CP016826.1) con una variación en la posición 645 con una Citosina en vez de Timina. La comparación con las secuencias de *pld* de las cepas MEX1 (CP017711.1), MEX2 (CP046644.1) y MEX9 (CP014543.1) evidenció una identidad del 99.81 % con 2 variaciones en las bases nitrogenadas de las posiciones 645 (C/T) y 1069 (C/T). El análisis de la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de nucleótidos de PLDr 2J-L presentó un 100% de identidad con respecto a las proteínas PLD de las cepas mexicanas MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29. Las variaciones identificadas no involucraron residuos de aa del sitio catalítico H (44-78), unión a Mg²⁺ E-D posición (64-66) y D posición (112), la hendidura del sitio activo H (44) -E (64) -D (66) -H (78) -D (112) -K (114) -W (242) o el lazo catalítico posición 77-DHDGIPTS-84/86-GATAE-90 (Rodríguez-Domínguez, 2020). La caracterización de la secuencia de la proteína recombinante PLDr 2J-L indicó que conserva las regiones involucradas en la actividad biológica, y su aplicación *in vivo* en el modelo murino confirmó su toxicidad.

El medio en que está disuelta la molécula, así como otros factores de la formulación influyen en la absorción de la misma y su toxicidad. Se a establecido *in vitro* que la toxina PLD presenta actividad hemolítica en suspensión a pH 6 o por debajo de este valor, y actividad de adhesión a glóbulos rojos a pH 7.5 o ligeramente alcalino. En el estudio de esta propiedad se utilizó un medio de agar sangre sólido acidificado para demostrar el grado de hemólisis que se podía obtener a un pH óptimo y su inhibición por suero inmune (Burrell, 1979). La purificación de la proteína PLDr 2J-L se realizó mediante cromatografía de afinidad con NNTA Fast star Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo de desnaturalización, y la solución que se utilizó para la elusión final es de pH 4.5. Por lo que el pH ácido de la solución final en la que se obtiene la proteína recombinante puede favorecer su actividad hemolítica. Por otra parte para la formulación de la vacuna se utilizó como solvente PBS, solución de pH 7.2, por lo que el valor neutro podría facilitar *in vivo* la adhesión de PLDr 2J-L a los glóbulos rojos.

Otra de las funciones de la toxina PLD como factor de virulencia es su actividad enzimática de esfingomielinasa (SMasa) y se ha identificado que esta puede provocar la inhibición de la entrada de Ca (2⁺) en los LinF T humanos y reducir la producción de IL-2, citocina fundamental para la proliferación y diferenciación de las células T, así como también disminuye el factor de necrosis tumoral α , que es crucial para la formación y mantenimiento de los granulomas en las infecciones microbianas. En este trabajo también se sugiere que la acción SMasa de PLD tiene la capacidad de suprimir la actividad del gen *Orai1*, creando una afección crónica adquirida similar a la SCID (inmunodeficiencia combinada grave causada por mutaciones genéticas) que permite la infección persistente. PLD puede alterar la función de la membrana al dirigirse a los fosfolípidos como mecanismo para combatir la inmunidad del hospedero (Combs y Lu, 2015). La toxina PLD favorece la permeabilidad vascular, la diseminación bacteriana y la persistencia en el interior de los macrófagos, siendo el factor de virulencia principal de *C. pseudotuberculosis* (Oliveira *et al.*, 2017a). Por tanto es uno de los antígenos con mayor potencial para el desarrollo de vacunas, siempre y cuando se presente de forma inactivada para evitar causar daños en el organismo.

La inactivación de la proteína se puede realizar utilizando diferentes procedimientos como manipulación genética, tratamiento químico o térmico. La conformación de las proteínas puede alterarse cuando se someten a agentes físicos, como elevadas temperaturas, radiación, congelación repetida, alta presión o productos químicos (ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y soluciones concentradas de urea) (Blanco, 2022).

La manipulación genética para la sustitución de residuos de aminoácidos involucrados en la actividad enzimática de PLD puede inactivar su toxicidad (Haynes *et al.*, 1992), pero se ha demostrado que conlleva a una disminución en su potencial inmunogénico. Esta afirmación quedo demostrada con el uso de la cepa atenuada Toxminus, donde el gen *pld* fue inactivado con modificación sitio especifica del nucleótido C129 (Hodgson *et al.*, 1992), que produjo

un cambio en el residuo de His-20, lo que modificó el sitio activo de la enzima y redujo la producción de PLD. Otras variaciones en la secuencia de aminoácidos se evaluaron para la posición His-20, donde la mayoría de los cambios inactivaron la PLD, excepto por lisina, arginina y glutamina, ya que la toxina conservó actividad enzimática medible (Tachedjian *et al.*, 1995). El aminoácido histidina de la posición 20 corresponde con el residuo de la secuencia YAIAHRVL (Murakami *et al.*, 2005) involucrada en el sitio catalítico de la enzima. Sin embargo, la aplicación de esta cepa atenuada como vacuna condujo a bajos niveles de la respuesta humoral y celular, y solo impidió la formación de abscesos en el 50 % de las ovejas desafiadas con una cepa virulenta (Hogdson *et al.*, 1994). La estrategia de inactivación vía modificación genética podría ser evaluada para PLD con el objetivo de modificar otros residuos de aa que no comprometan la actividad inmunogénica de la molécula. Este caso se observó en la inactivación de la toxina diftérica (DT), donde un cambio de ácido glutámico por glicina en la posición 52, obtenido mediante mutación puntual en la subunidad B fue capaz de eliminar por completo la toxicidad de DT, aunque distante al sitio activo de la ADP-ribosiltransferasa que se encuentra en la subunidad A. Esta modificación garantizó la inactivación de la toxicidad y no afectó la capacidad de la molécula para estimular el sistema inmunológico (Giannini *et al.*, 1984; Malito *et al.*, 2012). También se observó que el uso de la subunidad B de la toxina del cólera en lugar de la toxina completa, podría conducir a perfiles de seguridad mejorados con poca o ninguna disminución en la inmunogenicidad general (Baldauf *et al.*, 2015). La mejora en la seguridad se atribuyó a la falta del dominio A1, la porción de la toxina del cólera responsable de la actividad intracelular que conduce a los síntomas de la enfermedad.

Durante la obtención de la proteína PLDr 2J-L se utilizó el proceso de purificación según el método de desnaturalización para la resolución de cuerpos de inclusión, el cual involucra componentes químicos caotrópicos (Urea) y cambios de pH, pero luego de este proceso la proteína no modificó su actividad biológica. El tratamiento químico con formalina (formol 1%) se ha utilizado para la inactivación de la toxina PLD (Eggleton *et al.*, 1991; Hodgson *et al.*, 1999; Fontaine *et al.*, 2006) pero constituye un procedimiento que requiere de tiempo (25-30 días), y puede generar cantidades variables de actividad residual en el producto final.

La desnaturalización de la proteína mediante tratamiento térmico conlleva a cambios en su estructura producto al suministro de energía cinética con alteración en las fuerzas de dispersión y enlaces de hidrógeno débiles. Este proceso puede conllevar a la precipitación o coagulación de la proteína, por tal motivo en el trabajo se observó la formación de precipitado de color blanco. Luego de la desnaturalización la estructura superior de la proteína se pierde quedando la estructura primaria constituida por la secuencia lineal de aminoácidos (Engelking, 2015).

Existen referencias del uso del método térmico en la inactivación de 7 mg de la proteína PLD en 1 ml de PBS durante 15 minutos a temperatura de 75 °C. El procedimiento permitió la inactivación de la proteína, pero se mantuvo el 20% de la actividad hemolítica evaluada *in vitro* en medio de cultivo durante un período de 56 días (Muckle *et al.*, 1986). El método térmico también ha sido utilizado para la inactivación de la toxina botulínica (*Clostridium botulinum*) donde el tratamiento a 85 °C durante 1 min permitió la desnaturalización de todos los tipos de toxinas probados (A, B y C), así como a 90°C la toxina no fue detectable por bioensayo en ratones después de 30 segundos de calentamiento (Smart y Rush, 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes las proteínas recombinantes utilizadas para el desarrollo de los formulados vacunales se sometieron a un proceso de desnaturalización mediante tratamiento térmico a 96°C durante 15 min, el cual fue eficiente para la inactivación de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L ya que no se reportaron muertes en los grupos experimentales.

En el grupo experimental inoculado con CP40r 2J-L (50µg) sin inactivar + Saponina (7.5µg) similar a la obtenida en el grupo control inoculado solo con Saponina (7.5µg), y ya que no se ha reportado previamente en la literatura efecto toxico para esta proteína, proponemos que la letalidad registrada en este grupo experimental pudo estar relacionado con el adyuvante Saponina o impurezas de la formulación. La molécula CP40 ha sido clasificada como proteína extracelular secretada por *C. pseudotuberculosis* con actividad enzimática endoglicosidasa. La actividad biológica de CP40 se relaciona con la capacidad enzimática que degrada la región Fc de anticuerpos IgG ovino. La caracterización de esta proteína en estudios previos permitió la identificación de un sitio activo enzimático similar al de endoglicosidasa Endo S de *Streptococcus pyogenes* y Endo E de *Enterococcus faecalis* (Shadnezhad *et al.*, 2016). El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *cp40* del aislado 2J-L evidenció un 100 % de similitud en comparación con la secuencia de este gen en la cepa mexicana MEX29 y 99.91 % con relación a *cp40* de MEX1, MEX2, MEX 9 con una variación en la posición 60 (C/T) y en MEX25 una variación en la posición 739 (G/C). El análisis de la secuencia de aminoácidos de CP40r 2J-L indicó un 100 % de identidad con respecto a las secuencias de CP40 de las cepas mexicanas evaluadas, excepto por MEX25 con un 99.47 % de similitud (Rodríguez-Domínguez, 2020). En la secuencia de aa de CP40r 2J-L se identificó el sitio activo de la familia de proteínas GH18_EndoS-like compuesto por los residuos Y (66) -F (104) -D (185) -D (187) -E (189) -Q (260) -Y (262) -Y (332) y también el motivo de quitinasa LDGLDVDME.

Las saponinas presentan una amplia variedad de actividades farmacológicas dentro de las que destacan su potencial inmunomodulador (Fernandez-Tejada *et al.*, 2016). En contraste con sus versátiles actividades beneficiosas, las saponinas por lo general poseen una toxicidad hemolítica perjudicial que deben ser identificadas antes de su aplicación en la medicina. La hemólisis inducida por saponina es una de las toxicidades más generales que comparten la mayoría de las saponinas, que puede causar lesiones o hemorragias en múltiples órganos y,

por lo tanto, amenazar la salud de los sujetos de prueba (Zheng *et al.*, 2019). Se ha planteado ampliamente la hipótesis de que este fenómeno es el resultado de las propiedades anfifílicas de las saponinas. Según ensayos *in vitro* basados en el modelo de bicapa lipídica y el modelo de célula completa, se propone que las saponinas interactúan con el colesterol en la membrana celular y generan poros, lo que conduce a la ruptura y la posterior liberación de hemoglobina desde el citosol de los eritrocitos a la solución extracelular (Lorent *et al.*, 2014). Wang y colaboradores informaron que la toxicidad hemolítica de las saponinas es proporcional al número de unidades sacáridas en las estructuras, y las saponinas con cadenas sacáridas ramificadas son más tóxicas que aquellas con cadenas rectas. Además de la importancia de las unidades sacáridas, también se concluye que la aglicona juega un papel clave en la toxicidad hemolítica de la saponina (Wang *et al.*, 2007). En *Quillaja saponaria* está presente un glicósido tóxico, el ácido quillajico, y la sapogenina senegina. La saponina utilizada en el presente trabajo contiene entre un 20-35% de sapogenina y se obtuvo de *Quillaja sp.* según las especificaciones del fabricante. El análisis de la dosis óptima de las saponinas QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21 purificadas de la corteza de *Quillaja saponaria*, fue evaluada en ratones para la respuesta adyuvante. Se analizaron QS-7 y QS-21 en un estudio de dosis-respuesta en la inmunización intradérmica con BSA en ratones; para ambas saponinas purificadas, la respuesta adyuvante (determinada por estimulación de los títulos de anticuerpos por ELISA) se acercó al máximo en dosis de 5µg y se demostró que se estabilizaba hasta la dosis más alta analizada, 80µg. Estas saponinas purificadas varían considerablemente en su toxicidad, según se evaluó por su letalidad en ratones; el componente principal, QS-18, fue el más tóxico. Las saponinas QS-7 y QS-21 mostraron una toxicidad nula o muy baja en ratones, respectivamente. Ninguna de estas saponinas estimuló la producción de anticuerpos reagínicos. Los monosacáridos de estas saponinas presentaron composiciones similares ya que contenían fucosa, xilosa, galactosa y ácido glucurónico. Se observaron diferencias predominantes en las cantidades de ramnosa, arabinosa y glucosa (Kensil *et al.*, 1991).

El estudio permitió realizar el cálculo de la DL, identificar los órganos blanco y otras manifestaciones clínicas de toxicidad de las formulaciones, y establecer un intervalo de dosis para la aplicación de la vacuna en el análisis de la respuesta inmune.

IX.3.1 Reactivación de la virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 utilizada para el desafío de los animales vacunados.

La cepa *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* ATCC 43926, también nombrada *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Buchanan) Eberson proviene de un absceso de oveja y ha sido utilizada en estudios previos como cepa control. En el presente trabajo la bacteria a la concentración de 10⁶ UFC/mL provocó la muerte de los animales infectados en un rango de 10 días, sin la formación de abscesos. Por su parte, a la concentración de 10⁴ UFC/mL se

formó un absceso en el sitio de inoculación (vía intraperitoneal) del cual se tomó muestra y se cultivó en agar sangre, permitiendo el aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* y su confirmación se llevó a cabo mediante PCR Cuadruplex (Almeida *et al.*, 2017). En un estudio previo en el que fue utilizada como cepa control para la identificación mediante PCR, se identificaron los genes ARNr 16S, *rpoB*, *pld* y *cp40* (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2022). Otro trabajo permitió la caracterización del perfil de proteínas expresadas por la cepa ATCC 43926 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE y western blot. Se identificaron proteínas de alta masa molecular con peso molecular por encima a 119 kDa, tres proteínas con masa molecular de 84, 64 y 58 kDa, proteínas de 33 a 30 kDa, y proteínas de baja masa molecular de 25 a 20 kDa. Se utilizaron sueros de cabras con enfermedad inducida por *C. pseudotuberculosis* para investigar inmunotransferencias de proteínas solubles en SDS sometidas a electroforesis. El análisis por western blot utilizando suero de cabras infectadas de forma natural permitió el reconocimiento de 10 o más proteínas con una masa molecular que oscilaba entre 119 y 20 kDa (Braithwaite *et al.*, 1993). También fue utilizada como cepa de desafío para la evaluación en ovinos de la eficacia de formulados vacunales de cultivos totales inactivados de *C. pseudotuberculosis ovis* aislados de origen mexicanos (García, 2017). Corache y colaboradores reactivaron la virulencia de esta cepa en ratones BALB/c inoculados vía subcutánea en la región del lomo con 0.1 mL a una concentración de 8×10^6 UFC. En el experimento se registró la formación de un absceso subcutáneo en el sitio de inoculación del cual se re-aisló la bacteria. La misma cepa fue utilizada para el desafío de ovinos vacunados con cultivos totales inactivados y grupo control de la enfermedad. En los animales no vacunados y desafiados (3 de 4) la cepa fue capaz de desarrollar un cuadro clínico característico de LAC, con la formación de abscesos subcutáneos en nódulo preescapular derecho y absceso en el lóbulo craneal del pulmón. Se identificaron lesiones en pulmones con engrosamiento del septo alveolar, presencia de células mononucleares y polimorfonucleares, hiperplasia del BALT, hemorragia y presencia de exudado en bronquios, así como la presencia de macrófagos y la observación de infiltración linfoide. Por otra parte, las lesiones en nódulos linfáticos evidenciaron centros germinales activos con presencia de células plasmáticas e hiperplasia difusa de tejido linfoide (García, 2017). Estos resultados hacen referencia de la capacidad patogénica de la cepa ATCC 43926.

IX.3.2 Hallazgos clínico-patológicos en animales vacunados

Los formulados vacunales evaluados no provocaron lesiones en los animales, y el análisis histopatológico evidenció una respuesta del sistema inmune a nivel de sitio de inoculación y bazo. En la piel se identificó en los animales de los grupos vacunados infiltrado de células mononucleares luego de 21 días de concluido el esquema de inmunización. La vía de administración a través de inyección subcutánea ha sido utilizada en diversos estudios de vacunas contra LAC donde se emplea el modelo murino, obteniendo activación del sistema

inmune dirigía hacia antígenos vacunales (Silva *et al.*, 2018; Droppa-Almeida *et al.*, 2016). La piel se compone de tres capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis o grasa subcutánea. En estos tejidos se encuentran células que participan en la función del sistema inmune. La epidermis contiene cuatro estratos o capas que analizados desde lo interno hacia lo externo se clasifican en basal, espinoso, granuloso y el córneo. Se destacan en la epidermis células especializadas como los melanocitos y las células de Langerhans que permiten el desarrollo de interacciones con las células T que se encuentran en los estratos espinoso y basal (Valdivia-Silva *et al.*, 2014). En la epidermis, los queratinocitos forman una capa de epitelio estratificado con uniones estrechas que brindan protección como barrera impermeable al agua, y la secreción de citocinas por parte de estos promueve la inflamación durante una infección, lesión o punción generada durante la inoculación (Malissen *et al.*, 2014; Pasparakis *et al.*, 2024). La secreción de citocinas es mediada por los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 que se expresan en la membrana plasmática de los queratinocitos y TLR3, TLR9 en la membrana endosómica. Ante el reconocimiento de los PAMP por los TLR se activan vías de transmisión de señales como la de NF- κ B originando la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-8, IL-1, IL-2, IL-6 y TNF- α (Köllisch *et al.*, 2005). Otras células destacadas son los melanocitos que producen el pigmento de melanina, las células de Merkel que se comunican con las neuronas, las células T de memoria y las células inmunes innatas que se infiltran a estos tejidos (Woo *et al.*, 2015). Las fibras de colágeno y elastina entrelazadas proporcionan estructura y elasticidad y facilitan la migración de células dendríticas dérmicas (CD) que realizar inmunovigilancia. En comparación con las células dendríticas, los macrófagos dérmicos tienen una capacidad de presentación de antígenos y una actividad migratoria menor, pero una actividad fagocítica elevada, para mantener la homeostasis y facilitar la reparación o resolución de heridas (Malissen *et al.*, 2014). Los macrófagos residentes en la piel surgen de los depósitos precursores establecidos durante el periodo prenatal y de los monocitos sanguíneos después del nacimiento, y luego residen en la piel durante largos períodos para proporcionar una defensa temprana (Malissen *et al.*, 2014; Franken *et al.*, 2016). Durante la respuesta inmunitaria, los vasos sanguíneos dérmicos facilitan el reclutamiento y la infiltración de células inmunitarias innatas y efectoras circulantes en la piel. Las células endoteliales regulan la extravasación mediante la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión leucocítica (Richmond *et al.*, 2014). Por su parte la dermis presenta células inmunes especializadas como CD, linfocitos Th CD4⁺, linfocitos T $\gamma\delta$ y células natural killer, además de macrófagos, mastocitos, fibroblastos y células relacionadas a los nervios autónomos. La dermis es drenada por conductos linfáticos y vasculares que son las vías del tráfico celular. Los macrófagos también inician la infiltración de granulocitos en la piel, y los macrófagos perivasculares son la principal fuente de quimioatrayentes (CXCL1, CXCL2) en la dermis, lo que promueve la extravasación de neutrófilos en las vénulas poscapilares en respuesta a una infección bacteriana (Abtin *et al.*, 2014). Los monocitos son reclutados en la piel durante la

homeostasis y en respuesta a una infección para diferenciarse en macrófagos o células dendríticas mieloides (Richmond *et al.*, 2014). Las células efectoras reclutadas en la piel temporalmente o que se convierten en células residentes en la piel incluyen células T citotóxicas CD8⁺, células Th CD4⁺ y células Treg CD4⁺. La maduración de las CD cutáneas tras la estimulación patógena es diferente de la maduración homeostática, en la que las moléculas coestimulantes se regulan positivamente y las CD migran a los nódulos linfáticos para promover la diferenciación y proliferación de células T específicas de antígenos vírgenes (Malissen *et al.*, 2014).

Las células dendríticas CD1a⁺ dérmicas en humanos pueden inducir la polarización Th2 de las células T CD4⁺ vírgenes, así como la diferenciación de las células T CD8⁺ vírgenes en CTL potentes, aunque no tan eficaces como las células de Langerhans (CL) (Klechevsky *et al.*, 2008).

Las células de Langerhans son células dendríticas especializadas de la piel, que como APC juegan un papel clave en la epidermis para reconocer antígenos invasores (Kashem *et al.*, 2017). Las CL se desarrollan a partir de progenitores derivados del saco vitelino y adquieren un fenotipo y una morfología dendríticos inmediatamente después del nacimiento, luego la proliferación *in situ* y la interleucina (IL)-34 derivada de los queratinocitos ayudan a mantener su población (Pasparakis *et al.*, 2014). Al madurar, las CL migran a los nódulos linfáticos regionales para inducir la producción de células Th2 a partir de LT CD4⁺ vírgenes a través de la señalización de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), así como la polarización de las células Th1 a las células T CD4⁺ productoras de IFN γ (Nakajima *et al.*, 2012). Las CL también participan en la diferenciación de las células T colaboradoras foliculares (Th F) y en las respuestas de las células B del centro germinal (Levin *et al.*, 2017). Otro rol importante de las CL en la inmunidad celular es la participación en la diferenciación de las células T CD8⁺ vírgenes en potentes linfocitos T citotóxicos y la mediación de respuesta telorogénica (Klechevsky *et al.*, 2008). Estudios *in vivo* proponen que las CD dérmicas CD103⁺ y langerina⁺, constituyen las poblaciones celulares de mayor relevancia para la activación del sistema inmune durante cuadros de infección (Zhao *et al.*, 2003; Allan *et al.*, 2003).

Ante la aplicación de la primera dosis de los formulados vía subcutánea se ponen en contacto las proteínas antigénicas con las células dendríticas residentes en la piel, las células dendríticas derivadas de monocitos y células inmunes innatas o efectoras reclutadas en la piel durante la respuesta inmune. Para que ocurra la presentación de antígenos las células APC activadas migran hacia los nódulos linfáticos más cercanos y las proteínas deben llegar a estos a través de la linfa. A diferencia de la administración intravenosa, las proteínas administradas por vía subcutánea deben ser absorbidas desde el lugar de la inyección hasta la circulación sanguínea. Las proteínas o péptidos de tamaño inferior a 16 kDa pueden

transportarse desde el lugar de inoculación hasta la circulación sistémica mediante su difusión por los capilares sanguíneos; sin embargo, en el caso de las proteínas de mayor peso molecular como son PLD (30 kDa) y CP40 (42 kDa) dependen de la transportación vía linfática a la circulación sistémica (McLennan *et al.*, 2005). Estudios en ratones han demostrado además que la tasa de pérdida de proteína del sitio de inyección vía Subcutánea se correlaciona inversamente con el peso molecular de la proteína en el rango de 23 a 149 kDa, siendo la proteína de 149 kDa la que se elimina más lentamente (Wu *et al.*, 2012). El valor de tiempo medio para alcanzar los niveles máximos de proteína en los nódulos linfáticos axilares drenantes obtenidos en ratones fue de 3 h para proteínas de 149 kDa en comparación con tiempos más cortos de poco menos de 1 h para las proteínas de 23, 44,3 y 66 kDa (Wu *et al.*, 2012). Los autores plantean que una tasa más lenta de salida del espacio subcutáneo y una mayor exposición inmunológica de proteínas de alto peso molecular en los nódulos linfáticos se traduce en una respuesta inmunitaria aumentada. Los estudios de distribución de nódulos linfáticos y farmacocinética demuestran la llegada de proteínas administradas por vía subcutánea a los nódulos linfáticos en cuestión de horas (Fathallah *et al.*, 2013). La segunda ronda de presentación de antígenos ocurre luego de 24 h de la inyección, cuando las células dendríticas migratorias derivadas de la piel llegan a los nódulos linfáticos desmielinizados con grandes cantidades de proteína adquirida en el sitio de la inyección (Itano *et al.*, 2003). La migración celular a los nódulos linfáticos desmielinizados para la segunda presentación de antígenos es impulsada por la interacción receptor-ligando de CCR7 y CXCR4 sobre expresada en las células dendríticas dérmicas maduras con ligandos expresados dentro de los vasos linfáticos (Kabashima *et al.*, 2007). Además de la señalización de quimiocinas, las enzimas metaloproteinasas de matriz (MMP) son esenciales para el movimiento de las células dendríticas a través de la piel. La producción de MMP-2 y MMP-9 por parte de las células dendríticas, además de la señalización de CXCL12 de CXCR4 facilita la translocación de las células dendríticas activadas a través de la membrana basal hacia la dermis (Förster *et al.*, 2012). Las MMP también degradan el colágeno, lo que podría ayudar al movimiento de las células dendríticas en la dermis hacia los vasos linfáticos iniciales, y la MMP9 inducida por la prostaglandina E2 durante la inflamación es esencial para la migración de las células dendríticas a los nódulos linfáticos dentarios (Yen *et al.*, 2008). Las citocinas proinflamatorias, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la IL-1 β , mejoran el tráfico linfático de las células dendríticas migratorias y las células dendríticas dérmicas mediante la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C), para aumentar los vasos linfáticos en el sitio inflamatorio y reducir la expresión de la molécula de adhesión E-cadherina en las células dendríticas (Hwang *et al.*, 2012).

También durante la segunda presentación de antígenos a las células T CD4⁺ por parte de las células dendríticas migratorias, se expresan altos niveles de MHC-II y receptor de IL-2 de las células T, ambas moléculas necesarias para la generación de células T CD4⁺ efectoras (Itano *et al.*, 2003). La activación de las células T CD4⁺ integra señales de múltiples

encuentros con células dendríticas portadoras de antígeno antes y después del compromiso de las células T con la división celular (Celli *et al.*, 2005). Los contactos subsiguientes entre las células T CD4⁺ recientemente activadas y las células dendríticas portadoras de antígeno promueven la expresión de CD25 de las células T y la producción de IFN γ . La primera presentación de antígeno mediada por las células dendríticas residentes en los nódulos linfáticos por sí sola no promueve eficientemente las respuestas de las células T_H y las células B, jugando un papel importante las células dendríticas migratorias derivadas de la piel para impulsar la inmunogenicidad de la proteína administrada por vía subcutánea. Las oportunidades de reencuentro de células dendríticas con células T refuerzan la activación de las células T CD4⁺; por lo tanto, la cantidad de células dendríticas portadoras de antígeno que llegan a los linfonodos podría ser un parámetro importante para la inmunogenicidad (Celli *et al.*, 2005). Las células dendríticas residentes en los nódulos linfáticos pueden participar en la segunda ola de presentación de antígenos después de la transferencia de antígenos por las células dendríticas migratorias (Allan *et al.*, 2006).

El reconocimiento inicial del antígeno peptídico en el contexto del MHC-II por las células T CD4⁺ específicas de antígeno ocurre dentro de las áreas de células T de los linfonodos drenados. Estas CD muestran niveles bajos de complejos péptido MHC-II e inician respuestas de células T CD4⁺ hacia el antígeno proteico a través de la activación de células T (fenotipo CD69⁺), la producción de IL-2 y la proliferación clonal (Allenspach *et al.*, 2008). Por lo tanto, se generan células T efectoras para mediar la respuesta inmunitaria en los tejidos periféricos linfoides secundarios y no linfoides (Gerner *et al.*, 2008). Las CD residentes en los nódulos linfáticos también retienen selectivamente linfocitos específicos de antígeno en los linfonodos inflamados a través de la expresión del MHC-II y la presentación de antígenos.

En el bazo de los animales vacunados se identificó en el grupo control del adyuvante (G2) hiperplasia leve difusa del tejido linfoide de los folículos, mientras que para el grupo G3: (PLDr+CP40r) la hiperplasia linfoide fue severa y en los grupos G4 (PLDr), G5 (CP40r) la hiperplasia del tejido linfoide de los folículos fue leve difusa. El análisis de estos tejidos es indicativo de una mayor activación a nivel de bazo de los animales inmunizados con la formulación en base a PLDr+CP40r. Durante los proceso de circulación de las proteínas estas pueden interactuar con monocitos sanguíneos circulantes, células dendríticas y macrófagos tisulares que establecen conexiones íntimas con células endoteliales y epiteliales. En el bazo, órgano linfoide secundario, se encuentra la pulpa blanca (WP) que contiene vainas linfoides diferenciadas según la señalización de quimiocinas: poblaciones de células B en los folículos de células B, mientras que CCL19 y CCL21 atraen a las células T CCR7⁺ y a las células dendríticas a la vaina linfoide periarticular o a la zona de células T que rodea la arteriola central (Lewis *et al.*, 2019). El antígeno proteico se distribuye al bazo a través de las arteriolas terminales que terminan en los senos de la zona marginal o zona perifolicular

que rodea la pulpa blanca (Bronte *et al.*, 2013). Las proteínas vacunales podría entrar en contacto con células APC residentes de la zona marginal, como macrófagos, CD y células B, ubicadas en posiciones ideales para detectar y responder a los antígenos transmitidos por la sangre a través de mecanismos independientes y dependientes de células T (Hey *et al.*, 2012). Los macrófagos y LinF B de la zona marginal reconocen los antígenos, estos pueden acumularse en la zona marginal o en el parénquima del bazo, pulpa roja, después de la infusión intravenosa. La proteína transportada por la sangre también puede ser fagocitada y procesada por macrófagos sinusoidales, macrófagos pericapilares o macrófagos de la pulpa roja (Hume *et al.*, 2008). Los macrófagos de la pulpa roja por lo general pueden eliminar partículas grandes (> 200 nm) que se retienen por más tiempo, mientras que las partículas pequeñas son internalizadas principalmente por los macrófagos de la zona marginal (Cataldi *et al.*, 2017).

Para lograr una respuesta inmunitaria adaptativa se requiere la entrada de los antígenos a la zona de la pulpa blanca, y se ha visto que las CD con fenotipo CD8 α^- que capturan el antígeno proteico transportado por la sangre en la zona marginal o en la pulpa roja pueden iniciar respuestas de LinT CD4 $^+$. Junto con la captación de antígenos, la activación de las células dendríticas esplénicas inmaduras por estímulos inmunes innatos puede permitir que las células dendríticas maduren, alteren la expresión del receptor de quimiocinas y migren hacia la pulpa blanca (Calabro *et al.*, 2016). Las células dendríticas esplénicas reflejan los patrones de migración de las células dendríticas residentes en el tejido, que se mueven desde el tejido periférico o parénquima esplénico hacia el tejido linfoide (pulpa blanca) y en ambos casos la regulación positiva de CCR7 dirige la migración hacia las áreas de células T (Calabro *et al.*, 2016). Las interacciones de las proteínas antigénicas con los subconjuntos dinámicos de APC de la piel que tienen una capacidad de procesamiento y presentación de antígenos altamente eficiente, así como actividad migratoria, son responsables de impulsar la inmunogenicidad luego de la administración vía subcutánea. En el grupo control de adyuvante Saponina se evidenciaron cambios en los tejidos analizados con presencia de células involucradas en la respuesta inmune. Se ha demostrado que la saponina derivada de Quillaja saponaria Molina estimula la inmunidad humoral y celular, además de inducir isotipos diferenciales de anticuerpos (Wang, 2021). Kensil y colaboradores estudiaron 10 picos de la fracción acuosa de *Q. saponaria*, donde se identificó la saponina correspondiente encontrando el pico QS-21 (Kensil *et al.*, 1991). Los estudios han demostrado que QS-21 promueve elevadas respuestas de anticuerpos específicos de antígeno y de células T CD8 $^+$ en ratones y que favorece una producción equilibrada tanto de IgG1 como de IgG2a. También han demostrado que QS-21 estimula la producción de linfocitos T citotóxicos (CTL), induce citocinas Th1, interleucina-2 e interferón gamma (IL-2 e IFN- γ) y anticuerpos del isotipo IgG2a contra antígenos proteicos (Sun *et al.*, 2009; Wang, 2021; Zhao *et al.*, 2023). En función del mecanismo de acción de los adyuvantes se puede mejorar la respuesta inmunitaria facilitando la fagocitosis

y la desaceleración de la salida del antígeno del sitio de la inyección para promover la captación y el tráfico del antígeno por parte de las células dendríticas migratorias.

IX.3.3 Porcentaje de Supervivencia y hallazgos clínico-patológicos en animales desafiados.

El estudio de eficacia de los formulados vacunales evaluados en el modelo murino evidenció el potencial inmunológico de las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, alcanzando porcentajes de supervivencia de 75% (G3) y 70- 65% (G4 y G5). Los resultados son superiores a los obtenidos por Silva y colaboradores que reportaron tasas de supervivencia de 30% (rPLD), 40% (rPLD + rCP09720) y 50% (rPLD + rCP01850) en animales vacunados con estas proteínas y desafiados con una cepa de *C. pseudotuberculosis* virulenta (Silva *et al.*, 2018). También los porcentajes de supervivencia superan los reportados por Barral y colaboradores que evaluaron la proteína fusionada MBP:PLD:CP40 y las proteínas recombinantes PLD modificada (25µg) y CP40 (25µg), obteniendo 57.14% y 42.86%, respectivamente (Barral *et al.*, 2022). Otro trabajo mostro resultados de supervivencia de un 40% en animales vacunados con *E. coli* bacterina/pAE/pld y 30% en animales inmunizados con PLD recombinante, luego de 40 días post desafío (de Pihno *et al.*, 2021). También se reportó un porcentaje de supervivencia de 62.5% en ratones Swiss vacunados con 2 dosis de CP40r + saponina, y desafiados con *C. pseudotuberculosis* cepa CPNS (1,0 x 10⁷ UFC/mL) (Droppa-Almeida *et al.*, 2021).

Sin embargo, otro grupo de investigadores obtuvo un porcentaje de supervivencia superior (88%) en un trabajo que combino la proteína PLDr (50µg) con una cepa de *Mycobacterium bovis* modificada con un plásmido pUS2000/pld para la expresión de PLDr (Leal *et al.*, 2018). También se ha reportado protección por CP40r en un 90% de los animales desafíos con la cepa virulenta MIC-6, mientras que la combinación con la cepa atenuada CP09 confirió un 70%, la aplicación de CP40r seguido de la inmunización con CP09 protegió al 60% y la cepa CP09 por si sola al 50% (Silva *et al.*, 2014). Otra vacuna de subunidades en base a CP40r + saponina o adyuvante completo de Freud (ACF) fue evaluada en ratones BALB/c, los cuales se sometieron a infección experimental con 10⁴ UFC/mL de *C. pseudotuberculosis* cepa virulenta C57. La formulación en base a CP40r / saponina protegió al 100% de los animales desafiados, a diferencia del grupo control negativo (Droppa-Almeida *et al.*, 2016). También se evaluó la tasa de supervivencia de ratones vacunados con *Mycobacterium bovis* BCG transformada para la producción de CP40 o CP09720, desafiados con *C. pseudotuberculosis* cepa MIC-6. La tasa de supervivencia más alta fue del 90% y se observó en el grupo vacunado con *M. bovis* BCG/cp40 reforzado con CP40r, seguida de un 80% en el grupo *M. bovis* BCG/cp09720 reforzado con rCP09720 (de Pinho *et al.*, 2024). Los resultados obtenidos en el modelo murino sugieren que estas moléculas factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* constituyen candidatos para el desarrollo de vacunas. Existen referencias del uso de PLD para la inmunización de ovinos y caprinos en formulados

vacunales comerciales y experimentales con la obtención de niveles de protección elevados (Bastos *et al.*, 2012; de Pihno *et al.*, 2021). La proteína PLD (50µg) obtenida por vía recombinante en *E. coli* aplicada en conjunto con cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* (1.25×10^{10} células/mL) inactivados con formalina se evaluó en ovejas desafiadas con una cepa de *C. pseudotuberculosis* virulenta (10^4 UFC/mL). En este trabajo la vacuna comercial Glanvac 3 (Commonwealth Serum Laboratories (CSL) Ltd., Victoria, Australia) y el cultivo total de *C. pseudotuberculosis* inactivado se utilizaron como vacunas controles. La producción de IgG totales fue superior en los grupos que incluyeron PLDr, en comparación con los grupos controles. No se formaron abscesos en los animales de los grupos vacunados con PLDr y PLDr + células totales inactivadas, presentando solo este último lesiones en el sitio de inoculación que fueron resueltas (Fontaine *et al.*, 2006). Por otra parte, en ovejas se evaluó el efecto inmunoprotector de CP40r (100µg) obtenido vía recombinante donde se reportó un 82% de protección ante la infección experimental con una cepa virulenta, así como también disminución en el desarrollo de abscesos a nivel de pulmón (afectaciones solo en un 2% de los animales). No se detectaron cambios significativos en la respuesta inmune humoral pero sí una disminución en el desarrollo de lesiones pulmonares, de ahí que se sugiere que la respuesta celular debe estar actuando en la protección (Walker *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995).

El modelo experimental murino ha sido de gran utilidad para el estudio de formulados vacunales y factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis*. El linaje de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados *in vitro* con la cepa virulenta CP1002 permitió mediante la técnica qRT-PCR la detección de genes factores de virulencia *PknG*, *Pld*, *CP40*, *NanH*, *SodC* y *SpaC*. En este estudio se identificó en tres intervalos de tiempo examinados (1, 12 y 24 horas después de la infección) la expresión de estos genes en los macrófagos, y todos los genes manifestaron mayor transcripción en macrófagos de los animales del linaje BALB/c (Correa *et al.*, 2018). Diversos formulados vacunales para la Linfadenitis caseosa han sido evaluados en ratones BALB/c (de Pinho *et al.*, 2021, Bezerra *et al.*, 2021) sin embargo en este modelo experimental establecer la dosis de desafío que permita el desarrollo de las manifestaciones de la enfermedad no siempre es eficiente. En nuestro trabajo el porcentaje de letalidad (100%) registrado luego del desafío en los grupos controles G2 (Saponina) y G6 (No vacunados) demostró la capacidad virulenta de la cepa utilizada, *Corynebacterium pseudotuberculosis* ATCC 43926 (10^4 UFC/mL). Además, en ambos grupos se documentó la formación de abscesos cutáneos en el sitio de inoculación y viscerales en bazo, hígado y riñones, siendo indicativo del desarrollo de la enfermedad en estos grupos de animales no vacunados. Estos resultados indican que en el modelo experimental murino, bajo las condiciones ensayadas, se logró simular la enfermedad.

Ensayos clínicos realizados en ratones BALB/c para el desarrollo de vacunas contra la LAC han demostrado que el desafío con determinadas cepas virulentas, como la MIC-6 (10^4 - 10^6 UFC/mL) generalmente resulta en septicemia y muerte, lo que causa sufrimiento a los

animales e impide el desarrollo de lesiones características de la enfermedad (Costa *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2014; Brum *et al.*, 2017). Silva y colaboradores, evaluaron una combinación de parámetros (cambio de peso, formación absceso, letargo y pérdida de cabello) durante 7 días antes y 30 días después del desafío, para establecer un criterio de valoración fiable con respecto al desarrollo de la LAC en el modelo murino. Después de la infección con MIC-6 los ratones perdieron peso, se debilitaron, y luego de 30 días se informó una tasa de mortalidad del 100%, quedando este intervalo de tiempo establecido como el mínimo necesario para llevar a punto final la experimentación con ratones infectados con la bacteria.

Por otra parte, la inoculación de ratones BALB/c con 5 aislados diferentes de *C. pseudotuberculosis ovis* (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 CFU/mL), mostró el potencial de reproducción de la enfermedad por parte de 3 de estos aislados que ocasionaron abscesos en órganos como el hígado, con la formación de microabscesos y reclutamiento de neutrófilos (Soares *et al.*, 2018).

Otro estudio previo en ratones inoculados con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* (10^9 UFC/mL) evidenció en los órganos analizados (ovarios, útero, testículos y epidídimo) infiltración de leucocitos polimorfonucleares con congestión, degeneración y necrosis. Además, se inocularon con la exotoxina PLD y los cambios celulares observados incluyeron hemorragia grave, formación de trombos, degeneración, vacuolación y necrosis (Osman *et al.*, 2013).

Estudios realizados por Meng y colaboradores analizaron en ratones el efecto patogénico de tres cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas de alpaca. La necropsia de los ratones infectados con la bacteria (grupo 10^7 UFC/mL) mostró dilatación del tracto gastrointestinal con acumulación significativa de líquido, manchas hemorrágicas en el hígado y un bazo congestionado y agrandado. Los ratones muertos no mostraron síntomas típicos de LAC lo que puede explicarse por la muerte aguda después de la inyección y el hecho de que los órganos infectados no tuvieron tiempo de desarrollar las lesiones orgánicas. Las secciones patológicas revelaron que había una congestión pronunciada de la vena central y una degeneración difusa de los lípidos de las células hepáticas en el tejido hepático. El tejido cardíaco no mostró anomalías aparentes. El tejido del bazo mostró irregularidades en la pulpa blanca, junto con numerosas vacuolas pequeñas y una gran área de focos hematopoyéticos extra medulares en la pulpa roja, con una cantidad significativa de infiltración de polimorfonucleares neutrófilos. El tejido pulmonar exhibió una extensa congestión y expansión intersticial alveolar, con solo unos pocos infiltrados de linfocitos observados alrededor de los vasos sanguíneos. El tejido renal mostró una pequeña cantidad de células epiteliales que sufrieron degeneración hidrópica celular y relajación citoplasmática (y una gran porción de congestión y expansión intersticial tubular renal. Luego de 14 días de la inoculación intraperitoneal de *C. pseudotuberculosis*, se observó un agrandamiento del bazo

(Meng *et al.*, 2023). En ovinos la inoculación de *C. pseudotuberculosis*, el sobrenadante del cultivo, así como la exotoxina fraccionada con sulfato de amonio o preparaciones purificadas mediante cromatografía se evaluó en pequeños rumiantes ($n = 13$) causando la muerte en un periodo de 48 horas. La evidencia histopatológica indicó que la exotoxina causó cambios necróticos en los túbulos contorneados proximales de los riñones. La inoculación con la bacteria provocó múltiples focos de inflamación supurativa en el músculo esquelético y el tejido adiposo adyacente, mientras que dichos cambios no se observaron en animales a los que se les administraron preparaciones de exotoxina (Hsu *et al.*, 1985).

Por su parte Mahmmoud y colaboradores en el 2015 reportaron en ovinos infectados con *C. pseudotuberculosis* y toxina PLD cambios patológicos: como edemas, congestión, infiltración de células inflamatorias, linfocitos y macrófagos principalmente, hemorragia, degeneración y necrosis en órganos como los pulmones, el corazón, el bazo, los riñones o nódulos linfáticos (Mahmmoud *et al.*, 2015).

Un estudio reciente realizado con muestras de ovejas y cabras con infección natural por *C. pseudotuberculosis* permitió identificar en órganos como el hígado, bazo, nódulos linfáticos internos y glándulas mamarias la formación de abscesos de diversos tamaños, con láminas concéntricas y aspecto de capa de cebolla, considerado un patrón patognomónico de la LAC. Los abscesos también presentaban aspecto cremoso con pus verde y un centro rodeado de una capsula formada por tejido conectivo denso. El análisis histopatológico evidenció en hígado una masa necrótica, bacterias, zonas de calcificación e infiltración de células mononucleares. En el hígado también se observó fibrosis e infiltrado de neutrófilos y linfocitos. En la periferia del piogranuloma se observó inflamación crónica organizada por capas: en el interior una capa de membrana piogénica rodeada de material necrótico, luego una capa de macrófagos y más al exterior una capa de linfocitos. En pulmones se identificó neumonía supurativa, alveolos aumentados de tamaño, necrosis e infiltración de neutrófilos. (Torky *et al.*, 2023).

Los diversos resultados expuestos están en concordancia con los obtenidos en el presente trabajo y sirven de referencia para la caracterización de las lesiones identificadas en los ratones controles del desafío. Otra evidencia del grado de protección conferido por los formulados vacunales evaluados es la disminución en la formación de abscesos y desarrollo de lesiones características de la LAC en órganos de animales vacunados 30 días post desafío con *C. pseudotuberculosis* cepa ATCC 43926 (10^4 UFC/mL). En los animales del grupo vacunado con PLDr no se reportó la formación de abscesos, mientras que en los grupos G3 (PLDr+CP40r) y G5 (CP40r) se formaron abscesos en 1 animal de cada grupo. La selección del modelo animal implica que los resultados puedan ser extrapolados al modelo final (ovino y caprino) y que respalden la eficacia de la vacuna en cada especie de destino.

También se ha visto que la ruta de desafío favorece la aparición de signos clínicos o lesiones en determinados órganos. La inoculación de *C. pseudotuberculosis* (10^9 UFC/mL) vía oral

en ratones BALB/c mostró en muestras de pulmón infiltración de neutrófilos, macrófagos, aumento en la vascularización, y hemorragias en el lumen alveolar con la formación de micro abscesos. Lesiones similares se identificaron en el hígado con la presencia de infiltrado de neutrófilos y macrófagos. En los riñones se detectó hemorragia, degeneración, congestión y necrosis tubular (Jesse *et al.*, 2013).

La respuesta inmune de ratones BALB/c infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepas T1 y C57 fue evaluada después de 70 días de infección. La cepa C57 indujo cambios morfológicos más pronunciados que la cepa T1, con un aumento en las células T CD4⁺ y T CD8⁺ identificadas durante la infección con la cepa C57. Las citocinas del perfil inflamatorio IL-1 α e IL-6 y las reguladoras IL-13 e IL-10 presentaron diferencias significativas. Las citocinas IL-2, IL-4, INF- γ , IL-22, IL-21 e IL-27 no difirieron significativamente entre los grupos (Tavares *et al.*, 2024).

IX.3.4 Estandarización de los sistemas ELISA anti-PLDr, anti-CP40r y anti PLDr+CP40r.

Para determinar la eficacia de la vacuna se utilizaron pruebas de alto rendimiento, robustez, y que permitieron trabajar con pequeños volúmenes de muestra. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es el método clásico para evaluar las respuestas serológicas y esta prueba se ha utilizado ampliamente para la detección de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis* mostrando un elevado rendimiento. Se trabajó en la optimización del métodos serológico ELISA anti-PLDr 2J-L, anti-CP40r 2J-L y anti-PLDr+CP40r para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba en la detección de los anticuerpos de los animales de cada grupo experimental. Los sistemas ELISA normalizados para la detección de los anticuerpos contra PLD y CP40 mostraron valores de sensibilidad y especificidad más elevados cuando se utilizaron los antígenos a la concentración de 3.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tanto en los ensayos donde se utilizaron por individual como en conjunto. Los porcentajes de sensibilidad y especificidad fueron superiores en comparación con los obtenidos por Barral y colaboradores, quienes evaluaron diferentes concentraciones de las proteínas PLD y CP40 obtenidas vía recombinantes para la detección de IgG en ovinos y caprinos, reportando para PLDr 91% y 98.7%, para CP40r 75.6 % y 76%, mientras que la combinación de las proteínas PLDr + CP40r (94.8%) mostro valores de sensibilidad superiores a los de nuestro trabajo. Por otra parte, Menzies y colaboradores en el 2004 reportaron un sistema de ELISA (PLDr como antígeno) con parámetros de sensibilidad (97%) superiores y especificidad (81%) menores a los reportados en el presente trabajo. Solanet y colaboradores diseñaron un sistema ELISA utilizando como antígeno cultivos totales inactivados (formol 0.5%) para la detección de IgG en carneros mostrando valores de sensibilidad de un 98% y una especificidad de un 100% (Solanet *et al.*, 2011). En otro trabajo donde se utilizaron antígenos secretados por la bacteria el sistema ELISA mostró valores de 98.5% de especificidad y un 93.5% de sensibilidad (Seyffert *et al.*, 2010). La

experiencia de Reboucas *et al.*, (2013) utilizando antígenos secretados en cultivos de *C. pseudotuberculosis* arribó a un 99% especificidad y un 89% sensibilidad (Reboucas *et al.*, 2013). Mientras que Sting y colaboradores describieron un sistema de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-PLD en sueros de cabras, utilizando como antígenos cultivos totales inactivados de *C. pseudotuberculosis* o PLDr, obteniendo 91% de sensibilidad y 100% de especificidad (Sting *et al.*, 2017). Es importante destacar que los sistemas normalizados con las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L permitieron alcanzar un 100% de especificidad lo cual permite la detección efectiva del total de muestras verdaderamente negativas. La sensibilidad para detectar las muestras verdaderamente positivas se podría aumentar realizando ajustes en la concentración de los antígenos de forma que permita la detección de anticuerpos cuando los sueros son débiles positivos. Por otra parte, el uso de proteínas recombinantes para el diseño de sistemas ELISA no solo garantiza la especificidad, sino también que los antígenos estén purificados y caracterizados.

IX.3.5 Evaluación de la respuesta inmune humoral (IgG Totales) mediante la técnica de ELISA.

La respuesta inmune adaptativa generada por una vacuna depende en gran medida de la capacidad que tengan los formulados para la activación de los linfocitos B y T, siendo los Linf B las células especializadas en la producción de los anticuerpos (Ac) (Khan y Ghazanfar, 2018). La detección de la respuesta serológica se puede utilizar como un biomarcador indicativo de la eficacia de la vacuna. Las inmunoglobulinas IgM se pueden localizar en la superficie de los Linf B o secretadas como pentámeros con forma circular, en la que se juntan 5 subunidades de monómeros unidos por enlaces de disulfuro y una cadena j. Los Ac de la clase IgM son los primeros que se sintetizan cuando tiene lugar el primer contacto con el antígeno. La IgM se secreta como respuesta rápida ante un antígeno y la presencia de estas moléculas en el suero son indicativo de una infección reciente en fases iniciales o aguda, aunque también se secretan durante la respuesta secundaria pero en una menor concentración. Por su parte las inmunoglobulinas IgG se generan frente a la exposición secundaria con los antígenos, están en mayor concentración en el suero, y se relacionan con la respuesta de defensa sistémica y de memoria. Esta subclase de Ac participa en la neutralización de los patógenos, activación del complemento con opsonización y fagocitosis de patógenos, así como promueven la muerte de las células infectadas mediante la activación de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (Abbas *et al.*, 2022). Por tales motivos, la detección de los anticuerpos IgG es necesario para la caracterización de la respuesta inmune inducida por las vacunas. En el presente trabajo se identificó un elevado título de anticuerpos IgG anti-PLD luego de los 21 días de aplicada la vacuna y los animales del grupo G3 presentaron altos títulos de IgG anti-PLD solo superados por el grupo G4, ambos con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Los niveles de anticuerpos de los grupos G3 (PLDr+CP40r) y G4 (PLDr) aumentaron alcanzando valores por encima de una DO=1.2 luego de 30 días del desafío. Estos resultados muestran la capacidad de los formulados en base a PLDr y PLDr y

CP40r para inducir una respuesta humoral de IgG anti-PLD con aumentos significativos luego del desafío. Se ha estudiado que la respuesta inmune en ovejas infectadas con *C. pseudotuberculosis* luego de 5-10 días post-infección (p.i) comienza con el desarrollo de los piogranulomas y la producción de Ac es detectable luego de 6-11 p.i alcanzándose títulos máximos entre el día 11 y 21 p.i. Los niveles disminuyen hasta los 140 días y no todos los individuos permanecen positivos durante las 20 semanas siguientes (El-Enbaawy *et al.*, 2005; Dorella *et al.*, 2009; Bastos, 2012). Por otra parte, el título de anticuerpos anti-PLD reportados por Vale y colaboradores fue menor en comparación con los alcanzados en nuestro trabajo. En ese trabajo se detectaron mediante ELISA los Ac anti-PLD en el suero de ratones BALB/c inoculados con la cepa atenuada T1 (10^7) siendo el valor máximo de DO de 0.5 alcanzado a los 120 días p.i. (Vale *et al.*, 2018). También se estableció que la subclase de anticuerpo IgG2 fue superior, manteniéndose elevada los 120 días de duración del experimento. Otro grupo de investigadores reportó valores de DO similares a los alcanzados en nuestro trabajo, con la diferencia de que los anticuerpos detectados fueron IgG anti-antígenos totales con valores de DO entre 0.8 y 1 en los animales vacunados con antígenos secretados (cepa T1) y con la cepa viva atenuada T1, mientras que luego del desafío se alcanzaron valores de DO entre 1 y 1.2 (Moura-Costa *et al.*, 2008). En otro trabajo los títulos de IgG de ratones (BALB/c) inmunizados con PLDr alcanzaron valores de DO=0.6 luego de 42 días post inoculación (de Pihno *et al.*, 2021). Recientemente, Moreira y colaboradores evaluaron la respuesta humoral inducida en ovejas inoculadas con 4 proteínas recombinantes (SpaC, NanH, SodC, and PLD) y su asociación con la cepa T1 de *C. pseudotuberculosis* inactivada, adyuvadas con Montanide™ ISA 61 VG. En este trabajo la proteína rPLD indujo IgG en los grupos experimentales (G2: SpaC, SodC, PLDr + Montanide y G3: NanH, SodC, PLDr + Montanide) luego de la segunda dosis, mostrando valores de DO entre 1 y 1.5, y luego del desafío se alcanzaron valores superiores a 1.5, con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.01$) (Moreira *et al.*, 2022). En el modelo experimental cobayos la inmunización con diferentes dosis de *C. pseudotuberculosis* (G1: 10^7 , G2: 10^6 , G3: 10^5) luego de 6 semanas evidenció elevados niveles de anticuerpos anti-PLD con DO entre 1 y 1.5, con diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($p < 0.05$) (Park *et al.*, 2024).

En el presente trabajo los niveles de anticuerpos anti-CP40 fueron superiores en el grupo G3 (PLDr+CP40r) en comparación con el grupo G5 (CP40r) tras 21 días de la primera inmunización, posteriormente a los 15 días de administrada la 2da inmunización (día 36) el grupo G5 mostró resultados superiores. Luego del desafío el grupo G5 presentó los niveles de anticuerpos más elevados en comparación con los grupos controles y el grupo experimental G3. Los niveles de anticuerpos anti-CP40 fueron menores que los alcanzados para PLD, siendo los valores máximos de DO (entre 0.25 y 0.3) para el grupos G5 (CP40r) seguido de G3 (PLDr+CP40r) luego de los 30 día post-desafío. Estos resultados son similares a los reportados por Droppa-Almeida y colaboradores en un experimento donde se inmunizaron ratones Swiss con 2 dosis de CP40r + saponina en un intervalo de 15 días y

luego de 30 días de concluido el esquema de vacunación fueron desafiados con la cepa CPNS ($1,0 \times 10^7$ UFC/mL). Los valores de absorbancias reportados fueron de 0.2 y 0.3 al día 60 de la primera inmunización, y se mantuvieron en ese rango luego de 120 días (Droppa-Almeida *et al.*, 2021). Otro grupo de investigadores reportó que en el modelo experimental murino (ratones BALB/c) inmunizados con CP40r (50µg) los títulos de anticuerpos IgG1 anti-CP40r fueron elevados alcanzando valores de DO por encima de 0.4 a los 30 días post inoculación. Sin embargo, luego del desafío los valores disminuyeron con DO entre 0.2 y 0.3 (Silva *et al.*, 2014). En otro trabajo la inmunización de ratones BALB/c (2 dosis de CP40r + saponina y desafío con la cepa C57 10^4 UFC/mL) aumento el título de IgG totales luego de 30 días post inmunización, y se alcanzaron absorbancias por encima de 1.2 luego de 60 días. En este trabajo durante la primera etapa de la vacunación (30 días) los valores se mantuvieron por debajo de 0.3 (Droppa-Almeida *et al.*, 2016). Por otra parte, Barral y colaboradores no reportaron aumento en los niveles de anticuerpos IgG totales en ratones BALB/c vacunados con proteínas modificadas PLDr +CP40r (25µg), con valores de DO entre 0.05 y 0.1 (Barral *et al.*, 2022).

El análisis de los anticuerpos IgG totales utilizando el sistema de ELISA recubierto con ambos antígenos sugiere que la respuesta humoral se encuentra favorecida hacia el antígeno PLD, ya que los niveles de respuesta alcanzados por los animales del G3 y G4 fueron similares, siendo solo superiores en el grupo G3 a los 72 días del experimento. Por su parte los valores de IgG totales en el grupo G5 se mantuvieron por debajo en todo momento del experimento.

El antígeno PLD constituye el factor de virulencia principal de la bacteria, es una toxina con un elevado potencial para estimular la activación de la respuesta inmune de tipo humoral según lo demostrado en los trabajos anteriormente citados. La formulación donde se combinaron ambas proteínas mostró un aumento con diferencias estadísticas significativas tanto en las etapas de vacunación como luego del desafío, con un aporte de anticuerpos anti-PLD. Existe jerarquía entre los epítomos de las proteínas y la presencia de epítomos inmunodominantes en la proteína PLD puede ser uno de los factores que influyen en el predominio de Ac contra esta molécula.

La maquinaria de procesamiento de antígenos está optimizada para la selección de los epítomos inmunodominantes. Para la presentación en el contexto del MHC de clase II, los antígenos internalizados de fuentes exógenas se mueven a través de una serie de compartimentos endosómicos en las APC que contienen moléculas accesorias como la DM y DO, y un conjunto de enzimas proteolíticas y desnaturalizantes principalmente catepsinas y tiol reductasa lisosomal inducible por interferón gamma, que generan y recortan los determinantes antigénicos (Bryant *et al.*, 2004; Jensen, 2007). La DM es una molécula necesaria para el desplazamiento eficiente del péptido CLIP del surco del MHC y su intercambio por los péptidos exógenos. Esta molécula es eficaz en disociar péptidos de unión débil con la hendidura P1 de las moléculas HLA-DR1 (DR). El intercambio de péptidos

mediado por DM interactúa de manera transitoria y repetida con moléculas de MHC- II, generando continuamente una conformación receptiva de péptidos que puede escanear segmentos de antígenos parcialmente plegados uniéndose y disociándose rápidamente hasta encontrar un péptido óptimo. El estudio del complejo DM/DR1 reveló que durante la interacción, DM provoca la inversión de un residuo de triptófano (DR α W43), que en el complejo peptídico DR1/HA interactúa con el residuo Tyr P1 del péptido y los residuos hidrofóbicos vecinos. La conformación dinámica general del MHC-II, además de la ocupación de la hendidura P1, determina la susceptibilidad al intercambio de péptidos mediado por HLA-DM y proporciona un mecanismo molecular para que el HLA-DM se dirija de manera eficiente a los complejos de péptidos/MHC-II (pMHC-II) que no encajan bien, editándolos para que sean más estables. Tras la eliminación de CLIP, la molécula DM ayuda en la selección de epítomos inmunodominantes al sesgar el equilibrio del pMHC-II que es resistente a la disociación mediada por DM. Por otra parte, la proteína DO se plantea que puede intervenir de dos formas: uniéndose a DM para inhibir su actividad, principalmente la eliminación del péptido CLIP o afectando de manera diferencial la presentación de péptidos estructuralmente diversos y actuando como una segunda chaperona junto con la DM para ajustar la selección del repertorio MHC-II.

También influyen en las propiedades inmunodominantes de los epítomos factores estructurales como la ubicación y su accesibilidad para ser capturados por el surco de las moléculas MHC-II. Para la obtención de las proteínas recombinantes se utilizó un diseño con cola de Histidina para facilitar el proceso de purificación. Pero debe tenerse en cuenta que esta modificación podría interferir en las características inmunodominantes de los péptidos que involucran estos residuos de Histidina. Una evidencia sobre este planteamiento corresponde al estudio de un candidato a vacuna recombinante contra la malaria, LSA-NRC, donde un epítomo inmunodominante, el LSA (434-453) ubicado en el extremo C de la proteína (residuos 434-443) contenía parte de una secuencia espaciadora y 4 residuos de Histidina añadidos artificialmente a la proteína con fines de purificación (Hillier *et al.*, 2005). El péptido que contiene la secuencia espaciadora fue el único que en ratones indujo respuestas fuertes de células T dependientes de la dosis. Sin embargo, en humanos no protegió a los individuos vacunados contra la malaria, probablemente porque los individuos inmunizados reconocieron selectivamente el epítomo que contenía el espaciador como el epítomo dominante, siendo diferente al péptido nativo (Spring *et al.*, 2009).

Otro ejemplo lo constituye el estudio realizado con la proteína PAD4 obtenida vía recombinante. Esta fue incubada con DR1 y DM seguido de la adición de CatB, CatH y CatS, lo que permitió el procesamiento y la selección de determinantes. Los péptidos unidos a DR1 (8 secuencias de péptidos derivados de PAD4) se eluyeron y analizaron por espectrometría de masas y se verificó su inmunogenicidad. El único péptido que indujo una respuesta de memoria contenía una parte de la secuencia espaciadora N-terminal (YKKAGFT) y residuos PAD4 N-terminales adyacentes. Cabe destacar que el espaciador agregado a esta proteína

PAD4 (que se llamará PAD4-A) era diferente en secuencia y su ubicación respecto del espaciador agregado a LSA-NRC. Por otra parte otra proteína PAD4 recombinante (PAD4-B) idéntica en su secuencia PAD4 nativa, excepto por una secuencia espaciadora diferente, GSAEGSS, también demostró un cambio en su epítipo inmunodominante involucrando la región espaciadora. Estos resultados corroboraron que con la adición de la secuencia espaciadora la inmunogenicidad de la proteína PAD4-A se desplazó de sus secuencias naturales a una secuencia artificial (Kim *et al.*, 2017). Por lo tanto, cuando se trata del diseño de proteínas recombinantes como candidatos a vacunas, incluso los cambios más pequeños en la secuencia y/o la estructura de la proteína pueden alterar por completo el procesamiento natural y la selección del epítipo inmunodominante.

También se establece una jerarquía inmunitaria cuando dos epítipos de diferentes proteínas compiten por la misma moléculas HLA-DR1, lo cual podría estar pasando en la formulación que combina PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. Existen evidencias de esta afirmación demostradas en un ensayo que utilizó una mezcla de LSA-NRC y proteína de influenza HA1-H5N1 en una proporción 1:1 para el procesamiento simultáneo. Los resultados de la espectrometría de masas indicaron solo una señal traza para LSA (436-449), pero picos prominentes derivados de H5N1-rHA1 que contenían HA (259-274). Los resultados se validaron *in vivo* cuando se inmunizaron ratones transgénicos DR1 con una mezcla de proteínas LSA-NRC y HA1-H5N1 en una proporción 1:1. El predominio del epítipo HA1-H5N1 no se redujo ni siquiera cuando las dos proteínas se mezclaron en proporciones de 2:1 o 4:1 a favor de LSA. Un ensayo de proliferación de células T de memoria mostró que las células T respondieron solo al HA1 y a su epítipo dominante HA (259-274), y no se observaron respuestas de memoria a LSA-NRC y LSA (436-449) (Sadegh-Nasseri y Kim, 2019). Existen múltiples razones que pueden contribuir a la inmunodominancia, incluida la posibilidad de diferencias en la estabilidad y/o la resistencia a DM, sin embargo se demostró que ambos péptidos formaban complejos estables con DR1 y eran insensibles a DM lo que valida que la falta de presentación de los epítipos dominantes de LSA no se debía a una mala unión a DR1 o a la falta de resistencia a la disociación mediada por DM. Las diferencias en la presentación de los epítipos inmunodominantes tampoco se debió a una falta de susceptibilidad a la digestión con cathepsina, ya que ambos epítipos sintéticos se digirieron cuando se incubaron solo con la mezcla de cathepsina. Sin embargo, como proteínas de longitud completa, la ubicación de los dos epítipos; en el extremo C de la proteína (epítipo LSA-NRC) o parte de la cabeza HA1 fuertemente plegada (epítipo H5N1-HA1 (259-274), hizo que la accesibilidad a la cathepsina fuera más difícil. Por lo tanto, se proporciona evidencia de que la ubicación del epítipo y las restricciones estructurales son contribuyentes a la selección de epítipos dominantes. La jerarquía de epítipos probablemente se establece durante la competencia por la unión al surco MHC- II y, como tal, cualquier factor que pueda causar un aumento en la longevidad de un epítipo, o su captura rápida, podría contribuir a su surgimiento como dominante. Podría ser el caso de CP40 el que sus epítipos inmunodominantes puedan volverse subdominantes o

crípticos cuando otros epítomos más robustos (PLD) están presentes simultáneamente. La ubicación de un epítomo en los extremos C o N de las proteínas podría aumentar la probabilidad de su captura por el MHC-II, así como la proteólisis por las enzimas de procesamiento.

IX.3.6 Fenotipificación mediante Citometría de Flujo de las poblaciones celulares (Linf B, Linf T y Monocitos) del Bazo de los animales vacunados y desafiados.

El desarrollo eficaz de las vacunas de nueva generación requiere de la evaluación de la respuesta inmune celular. Existe una deficiencia en la presentación de resultados de inmunogenicidad y seguridad a nivel celular, siendo mayormente presentados estudios de evaluación de respuesta humoral. En nuestro trabajo se utilizó la técnica de citometría de flujo para el análisis multiparamétrico de las principales poblaciones celulares que participan en la respuesta del sistema inmune. La inmunofenotipificación es la aplicación más utilizada en Citometría de Flujo, donde se usa la capacidad única de esta técnica de analizar simultáneamente poblaciones de células evaluando múltiples parámetros. En el trabajo se emplearon anticuerpos conjugados con fluorocromos dirigidos al reconocimiento de antígenos en la superficie de las células. La mayoría de las células inmunitarias tienen marcadores de CD específicos que las definen como una población de células. Estos marcadores de células se denominan marcadores de linaje (CD, Cluster de Diferenciación) y se utilizan para definir células específicas.

La población de Linf B se identificó a través del marcaje de su antígeno de superficie CD19, el cual es una proteína que se expresa temprano durante la diferenciación de células pre-B y persiste hasta la diferenciación terminal en células plasmáticas. El porcentaje de LinF B a los 21 días de la primera dosis de los formulados fue superior en los animales de los grupos experimentales G3 y G4 sin diferencias estadísticas significativas. En el grupo G5 los Linf B aumentaron sus niveles en comparación con los grupos controles, pero los valores se mantuvieron por debajo de los alcanzados por los grupos donde estuvo presente el antígeno PLDr. Estos resultados están en concordancia con lo obtenido en el sistema ELISA donde el título de Ac fue superior en los grupos experimentales inmunizados con PLDr. El comportamiento tras una segunda inmunización (42 días) mostró un aumento en los niveles de LinF B en todos los grupos inmunizados (G3, G4 y G5) con diferencias estadísticas significativas en comparación con los grupos controles. Luego de 30 días del desafío (72 días del experimento) se observó un aumento significativo en el porcentaje de LinF B en los grupos de animales vacunados, siendo superiores en el grupo G3 (PLDr + CP40r), seguido de G4 (PLDr) y G5 (CP40r). Estos resultados confirman el potencial inmunogénico de ambas proteínas y su capacidad de activación de la respuesta de tipo humoral. Anteriormente discutimos la importancia de la producción de anticuerpos y la relevancia de los resultados en comparación con otros formulados vacunales que han sido evaluados incluyendo estas

moléculas como antígenos. Cabe agregar que los LinF B determinados en el trabajo representan el conjunto total de esta población celular. Por lo que sería útil en próximos estudios analizar el subconjunto de las células de memoria. Las células B de memoria son importantes en la inmunidad inducida por vacunas, ya que pueden responder rápidamente a la infección contra el patógeno para brindar protección. Esta población es heterogénea con múltiples subconjuntos funcionales únicos. Estudios anteriores sugieren que la funcionalidad de las células B de memoria podría estar determinada por los marcadores del subconjunto CD80, PD-L2 y CD73 (He *et al.* 2017). La expresión de CD80 y PD-L2 marca un subconjunto de LinF B de memoria que pueden diferenciarse rápidamente en plasmablastos al reencontrarse con el antígeno (Zuccarino-Catania *et al.* 2014). Cuando se logra una afinidad elevada con los antígenos, un subconjunto de células B puede diferenciarse en células plasmáticas de larga vida (CPLV), las cuales son parte esencial del compartimento de memoria de las células B. Las CPLV secretan constantemente una gran cantidad de anticuerpos, que son responsables de mantener la concentración de los Ac circulantes después de la eliminación del antígeno. Estas células residen principalmente en la médula ósea y son diferenciadas con una vida útil que varía de meses a décadas (Brynjolfsson *et al.*, 2018; Khodadadi *et al.*, 2019). Estos marcadores podrían ser evaluados en próximos estudios para establecer el comportamiento de células de memoria ante la aplicación de la vacuna.

El porcentaje de monocitos detectados a partir de muestras del bazo fue bajo y solo se mostraron diferencias estadísticas significativas luego del desafío en el grupo G3, siendo el de mayor porcentaje. Los monocitos son leucocitos circulantes del linaje mieloide que median funciones esenciales de la inmunidad innata y adaptativa, incluida la fagocitosis y la producción de citocinas. Los monocitos de ratón representan alrededor del 1.5% del total de leucocitos de sangre periférica, lo que corresponde a menos de 100 células/L de volumen sanguíneo (Robbins y Swirski, 2010). Al presentarse en bajas concentración en la sangre se hace difícil su aislamiento o detección, y teniendo en cuenta el papel del bazo en la activación de la respuesta inmune, este fue seleccionado como diana para la evaluación de esta población celular. En el Bazo existe un reservorio de monocitos que se agrupan en la pulpa roja subcapsular y son distintos de otras poblaciones de macrófagos y células dendríticas en este órgano. A diferencia de los monocitos de la médula ósea, que requieren CCR2 para entrar en la circulación, la salida de monocitos esplénicos es independiente de CCR2. Señales como la angiotensina II movilizan a los monocitos esplénicos, que luego ingresan a la circulación y median la inmunidad en otros sitios tisulares (Robbins y Swirski, 2010). La presencia de numerosos monocitos en el bazo parece paradójica, porque los monocitos se distinguen de los descendientes de linaje en función de su residencia: los monocitos se consideran circulantes, mientras que los macrófagos y las células dendríticas residen en los tejidos. En el Bazo las células en la zona marginal son principalmente macrófagos (F4/CD80h) y células dendríticas (CD11h) y se localizan alrededor de la pulpa blanca, mientras que en la pulpa roja subcapsular se encuentran principalmente los monocitos. Los monocitos liberados del bazo o de la médula ósea son dirigidos hacia el sitio de afección

debido a citocinas quimioatrayentes como la CCL2, que tiene la función de señalar hacia dónde deben llegar; con la ayuda de otras moléculas como la interleucina 1 (IL-1), el factor TNF- α y la interleucina 6. Para favorecer el paso de estas células a través de los tejidos y llegar al sitio donde se encuentra el patógeno, estas citocinas ayudan a aumentar la permeabilidad vascular (Swirski *et al.*, 2009).

Para la obtención de la suspensión celular, el bazo fue sometido a un procedimiento de disgregación mecánica y química, lo cual puede haber afectado la concentración celular de esta población. Por otra parte la detección de los monocitos se realizó a través del marcaje con CD14 y se ha demostrado que este es expresado por miembros del linaje monocito-macrófago, incluidos los macrófagos del bazo, las células de Kupffer y las células epiteloideas. *In vitro* el cultivo de monocitos sanguíneos conduce a la maduración de macrófagos derivados de monocitos (MDM) y dependiendo de las condiciones de cultivo, la expresión de CD14 puede variar. La expresión diferencial de CD14 en macrófagos se ha identificado en macrófagos peritoneales como fuerte, mientras que los macrófagos alveolares se tiñen sólo débilmente. El CD14 está ausente en las células progenitoras tempranas y aumenta con la maduración hacia los monocitos. En la sangre, los monocitos pueden expresar niveles altos o bajos de CD14. Esta dicotomía también se puede observar con los macrófagos tisulares; los macrófagos peritoneales y los macrófagos pleurales expresan niveles altos de CD14, mientras que se observan niveles bajos de CD14 en los macrófagos alveolares y las células de la microglía (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1993).

En futuros estudios se podrían evaluar los subconjuntos de monocitos diferenciados en macrófagos: M1 o macrófagos activados de forma clásica, los cuales se originan cuando las células derivadas de la médula ósea se cultivan con desencadenantes inflamatorios como el LPS, mientras que los macrófagos M2, o macrófagos activados de forma alternativa, surgen cuando las células se cultivan con citocinas típicamente asociadas con la resolución de la inflamación, como IL-10. La detección podría realizarse teniendo en cuenta los mediadores inflamatorios activados para la diferenciación de M1 como IL-1, iNOS, ICAM y MMP9, mientras que los macrófagos M2 expresan arginasa, CCR7, IL-10, entre otros (Robbins y Swirski, 2010).

El marcaje con anticuerpos anti-CD3 se realizó como control para establecer la población global de LinF T. Los resultados mostraron que los LinF T totales luego de la primera inmunización aumentaron de manera similar en los grupos G3, G4 y G5 sin diferencias estadísticas entre los grupos. Luego de 42 días los porcentajes de células T fueron superiores en los grupos G3 y G5, lo que indica el potencial de la molécula CP40 para la activación de la respuesta de células T. Luego del desafío el grupo G3 mostró el porcentaje superior seguido de G4 y G5. El análisis de la población de LinF T CD4⁺ indicó que el grupo inmunizado con el formulado con ambas proteínas fue el que mayor porcentaje presentó durante la vacunación y el desafío. La evaluación del porcentaje celular de LinF T CD8⁺ luego de 30 días post desafío (72 días) indicó que el grupo G3 presentó los valores superiores, seguido de G5 y luego G4. Las células T CD8⁺ son responsable de controlar las infecciones

provocadas por patógenos intracelulares, lo que proporciona una justificación para incluir estas respuestas en un diseño de vacuna. Generalmente, la respuesta inmune celular ha sido evaluada a través del análisis del perfil de citocinas o del tipo de isotipo de inmunoglobulina inducido por las vacunas contra la LAC. Droppa-Almeida *et al.*, 2016 identificó un perfil de IgG de tipo IgG2a, IgG2b e IgG3 (sin la identificación de IgG1) lo que sugiere que la respuesta inducida tras la vacunación con la proteína CP40r es de tipos Th1. Por otra parte Silva y colaboradores, evidenciaron en el grupo de animales inmunizados con CP40r un aumento sig de IgG1, cambiando el perfil de IgG luego del desafío con un aumento significativo de IgG2 (Silva *et al.*, 2014). Este grupo de investigadores también evaluó formulaciones con PLDr como parte de los antígenos y demostraron que aumentaba la IgG 2, IFN- γ , TNF- α , mientras que la IL-12 no fue detectada (Silva *et al.*, 2019). Leal y colaboradores en el 2018 reportaron que la aplicación de una cepa de *Mycobacterium bovis* BCG transformada para la producción de PLDr indujo un aumento significativo en las IgG totales, IL-10 y IFN- γ (Leal *et al.*, 2018). Recientemente, este grupo de investigadores evaluó la respuesta inmune de ratones vacunados con *Mycobacterium bovis* BCG transformada para la producción de CP40 o CP09720. Se encontró una inducción significativa de IFN- γ e IL-10 en el grupo *M. bovis* BCG/cp40 y se registraron niveles más altos de IL-17 en el grupo *M. bovis* BCG/cp40 reforzado con CP40r en comparación con sus niveles en el grupo de control ($p < 0,05$) (de Pinho *et al.*, 2024).

El uso de adyuvantes en las formulaciones también puede favorecer el tipo de respuesta que se desea activar con la vacuna. La saponina estimula la inmunidad humoral y celular, y el mecanismo de acción se relaciona con la activación de citocinas IL-2 e IFN- γ y anticuerpos del isotipo IgG2, lo cual se asocia con un perfil de respuesta Th1. Varios estudios comparativos han demostrado que QS-21 superó significativamente a otras clases de adyuvantes, incluidas formulaciones de glucanos, peptidoglicanos, copolímeros de bloque anfófilos, nucleósidos bacterianos y lipopolisacáridos bacterianos, en el aumento de las respuestas de anticuerpos, así como de las respuestas de las células T contra los antígenos diana. (Wang, 2021; Zhao *et al.*, 2023). Palatnik de Sousa y colaboradores sugieren que la proporción de isómeros conformacionales del aldehído triterpénico es crucial para la integridad de la respuesta adyuvante Th1, así como los aldehídos axiales son más importantes en la respuesta inmune humoral, mientras que los aldehídos ecuatoriales son más relevantes para la respuesta inmune protectora celular (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004). La fracción de saponina QS21 favorece la producción de anticuerpos de tipo IgG2a y citoquinas del perfil Th1, como el IFN γ y la IL-2. Este adyuvante es uno de los más potentes y efectivos contra microorganismos intracelulares que requieren de respuesta inmune celular, que involucre a los Linf T citotóxicos (Wang, 2021).

Las emulsiones en agua-aceite como Montanide ISA 51 (aceite mineral y un surfactante de la familia de los mono-oleatos de manuro) y Montanide ISA 720 (que contiene escualeno) son adyuvantes utilizados para vacunas contra patógenos intracelulares (van Doorn *et al.*, 2016). El uso de Montanide ISA 51 en combinación con antígenos peptídicos derivado del

VIH (que contiene una mezcla de epítomos peptídicos de células B y T) mejoró la inmunogenicidad de la vacuna. Cuando se administró Montanide ISA 720 con una vacuna candidata contra la malaria (partícula central del virus de la hepatitis B (HBc) modificada que contiene epítomos peptídicos derivados de la proteína circumsporozoíto (CS) de *Plasmodium falciparum*, se descubrió que inducía una respuesta humoral más alta que el adyuvante derivado de aluminio. Por otra parte las emulsiones en aceite-agua con MF59 (compuestas de escualeno) han sido autorizadas en Europa como componente adyuvante de las vacunas contra la gripe. A diferencia de las emulsiones de agua en aceite (Azmi *et al.*, 2014), MF59 no proporciona un depósito de larga duración en el sitio de la inyección, se propone que el elemento clave para la adyuvancia es la inducción de la secreción de quimiocinas en el sitio de la inyección, lo que resulta en la captación de antígenos por los monocitos. Esto estimuló la diferenciación de monocitos en DC, facilitando su migración a los ganglios linfáticos locales donde se indujo la respuesta inmune adaptativa contra el antígeno de la vacuna. AS03, que está compuesto de α -tocoferol, escualeno y polisorbato 80. Se ha demostrado que este adyuvante desencadena una respuesta inmunitaria equivalente a una dosis 4 veces menor que el antígeno sin adyuvante. Se ha informado que el AS03 muestra su adyuvancia al mejorar la migración del antígeno a los ganglios linfáticos y activar el sistema inmunológico innato.

Las proteínas recombinantes SpaC, NanH, SodC y PLD de *C. pseudotuberculosis* fueron adyuvadas con MontanideTMISA 61 VG (T1M) para desencadenar respuestas inmunitarias humorales y celulares protectoras contra la infección por *C. pseudotuberculosis* inducida experimentalmente en ovejas. Las proteínas rSodC, rPLD y rNanH fueron más inmunogénicas, induciendo niveles significativos de anticuerpos IgG después de la primera dosis de la vacuna o después del desafío, manteniendo niveles constantes hasta el final del experimento. Los niveles de IFN- γ aumentaron después del desafío pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Moreira *et al.*, 2022).

Recientemente otro compuestos adyuvante se ha evaluado en el desarrollo de vacunas contra la LAC. El extracto lipídico de la macroalga *Iridaea cordata* se evaluó en ovejas con un diseño experimental que incluyó cuatro grupos de seis ovejas cada uno: solución salina estéril al 0,9% (G1), rCP01850 (G2), rCP01850 + *I. cordata* (G3) y rCP01850 + saponina (G4). Cada animal recibió dos dosis de vacuna con 30 días de diferencia. Los niveles de producción total de IgG aumentaron significativamente en los grupos experimentales G3 y G4 los días 30, 60 y 90. El día 90, G3 mostró una mayor producción total de IgG ($p < 0,05$) en comparación con G4. Al analizar la producción de citoquinas, G3 fue el único grupo experimental con niveles significativamente aumentados de expresión de ARNm de IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-10. La formulación de la vacuna con rCP01850 adyuvado al extracto lipídico de *I. cordata* provocó una respuesta inmune Th1 en ovejas, lo que indica que el extracto lipídico puede ser un adyuvante prometedor para desarrollar una vacuna eficaz contra la infección causada por *C. pseudotuberculosis* (Nogueira-Barbosa *et al.*, 2024).

El análisis global del porcentaje de las poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune inducidas a los 30 días post desafío mostraron que estas fueron superiores en los animales que recibieron la inmunización con ambas proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. Estos resultados demuestran el potencial de la formulación PLDr 2J-L y CP40r 2J-L + Saponina para inducir una respuesta de tipo humoral y celular. La eficacia del formulado también se demuestra en función de la evaluación de la formación de abscesos o lesiones características de la LAC, siendo el grupo G3 el que menos manifestaciones de la enfermedad presento. Los resultados obtenidos en el estudio de supervivencia complementan el análisis del potencial del formulado ya que los animales del grupo G3 fueron los que presentaron mayor porcentaje de supervivencia.

X. CONCLUSIONES

PRIMERA. La predicción *in silico* de la red de interacción de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L evidencio relación entre proteínas asociadas con la virulencia, la adquisición de hierro, adherencia y metabolismo.

SEGUNDA. La predicción *in silico* de epítomos de la proteína PLDr 2J-L para la activación de Linfocitos T indicó 16 péptidos (MHC-I) y 10 péptidos (MHC-II).

TERCERA. La predicción *in silico* de epítomos de la proteína CP40r 2J-L para la activación de Linfocitos T indicó 15 péptidos (MHC-I) y 10 péptidos (MHC-II).

CUARTA. Ambas proteínas contienen epítomos con capacidad de activación de LinF T en el contexto de diferentes alelos del MHC-I y MHC-II.

QUINTA. La simulación con el programa C-ImmSim evidenció la capacidad de las proteínas recombinantes de inducir una respuesta humoral con un aumento en la población de Linf B y la generación de respuesta adaptativa con la producción de IgG1, principalmente. Las poblaciones de LinF T CD4⁺ Th1 se presentaron en mayor proporción.

SEXTA. Las proteínas PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado mexicano 2J-L se expresaron utilizando el sistema heterólogo *E. coli* BL21 DE3 transformadas con el plásmido pET28a-pld y pET28a-cp40 y se purificaron mediante cromatografía de afinidad a cola de Histidina.

SÉPTIMA. Las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L sin inactivar mostraron dosis letales medias DL₅₀ de 36.11µg y 67.04µg, y dosis letales total DL₁₀₀ de 60.8µg y 122.7µg, respectivamente.

OCTAVA. El análisis histopatológico de muestras de órganos de los animales vacunados y desafiados mostro evidencia de la activación del sistema inmune con infiltración de células mononucleares e hiperplasia del tejido linfoide.

NOVENA. En los animales del Grupo 6 control del desafío se desarrollaron abscesos cutáneos y viscerales, mostrando evidencias de la reproducción de la enfermedad en el modelo murino.

DÉCIMA. Luego del desafío con *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926 el grupo vacunado con la formulación en base a PLDr 2J-L+CP40r 2J-L (Grupo 3) mostró un 75% de supervivencia seguido del Grupo 4 (PLDr 2J-L) con 70% y Grupo 5 (CP40r 2J-L) con 65%.

DÉCIMA PRIMERA. Se estandarizaron sistemas ELISA para la detección de IgG totales anti-PLD y anti-CP40 con porcentajes elevados de sensibilidad y especificidad.

DÉCIMA SEGUNDA. La respuesta inmune humoral evaluada mediante la detección de IgG totales mostró valores superiores en los Grupo G3 y G4, siendo el antígeno PLDr el de mayor contribución en la producción de anticuerpos.

DÉCIMA TERCERA. La respuesta inmune evaluada mediante la fenotipificación de las poblaciones de LinF B (CD19⁺), LinF T (CD4⁺, CD8⁺) y monocitos (CD14⁺) por citometría de flujo fue superior en los animales del grupo G3 inmunizados con ambas proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

DÉCIMA CUARTA. El formulado vacunal en base a las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L indujo una respuesta humoral y celular con protección del 75% de los animales desafiados.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., y Pillai, S. (2022). *Capítulo 6: Presentación del antígeno a los linfocitos T y funciones de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. Inmunología celular y molecular*. Editorial Elsevier Health Sciences. https://books.google.com.mx/books/about/Inmunolog%C3%ADa_celular_y_molecular.html?id=1OhkEAAAQBAJ&redir_esc=y.
2. Abe, I., Rohmer, M., Prestwich, G.C. (1993). Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews Journal*, 93, 2189–2206. <https://doi.org/10.1021/cr00022a009>.
3. Abtin, A., Jain, R., Mitchell, A.J., Roediger, B., Brzoska, A.J., Tikoo, S. (2014). Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nature Immunology*, 15(1), 45–53. <https://doi.org/10.1038/ni.2769>.
4. Aftabuzzaman, M., Pioquinto, J.M., Espiritu, H., Valette, E.J., Kim, S.H., Jin, S. J., Jung, M., Lee, S.S. Cho, Y.I. (2023). Pilot study on the distribution of caseous lymphadenitis in Korean native goats and the relationship between sex and age in disease occurrence. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1274359. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1274359>.
5. Alawam, A.S. y Alwethaynani, M.S. (2024). Construction of an aerolysin-based multi-epitope vaccine against *Aeromonas hydrophila*: an *in silico* machine learning and artificial intelligence-supported approach. *Frontiers in Immunology*, 15, 1369890. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1369890>.
6. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>.
7. Al-Gaabary, M.H., Osman, S.A., y Oreiby, A.F. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Ruminant Research*, 87, 116–121. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2009.10.008>.
8. Alhaji, S. S. (2011). A modified arithmetical method of Reed and Muench for determination of a relatively ideal median lethal dose (LD 50). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(12). <https://doi.org/10.5897/AJPP11.393>.
9. Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., Carbone, F. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8 α ⁺ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science*, 301, 1925–1928. <https://doi.org/10.1126/science.1087576>.
10. Allan, R.S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C.M., Villadangos, J.A., Zhan, Y. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity*, 25(1), 153–62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.017>.
11. Allenspach, E.J., Lemos, M.P., Porrett, P.M., Turka, L.A., Laufer, T.M. (2008). Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity*, 29(5), 795–806. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.013>.
12. Allman, D., y Miller, J.P. (2003). Common lymphoid progenitors, early B-lineage precursors, and IL-7: characterizing the trophic and instructive signals underlying early B cell development. *Journal of Immunology Research*, 27(2-3), 131–40. <https://doi.org/10.1385/IR:27:2-3:131>.
13. Almanaa, T. N. (2023). Design of a novel multi-epitopes vaccine against *Escherichia fergusonii*: a pan-proteome based *in-silico* approach. *Frontiers in Immunology*, 14, 1332378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1332378>.
14. Almeida, S., Dorneles, E., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J., Carneiro, A., Bagano, P., Spier, S., Barh, D., Lage, A. P., Figueiredo, H., Vasco, A. (2017). Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 290. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1210-5>.

15. Alves, J. R. A., de Farias, A. E. M., Dos Anjos, D. M., Lima, A. M. C., Faccioli-Martins, P. Y., de Souza, C. J. H., Pinheiro, R. R., Alves, F. S. F., de Azevedo, S. S., & Alves, C. J. (2020). Seroepidemiological study of Caseous lymphadenitis in sheep from the Northeast region of Brazil using an indirect ELISA. *Tropical animal health and production*, 52(4), 1945–1952. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02214-9>.
16. Amara, R.R., y Pulendran, B. (2020). T cell-inducing vaccine durably prevents mucosal SHIV infection even with lower neutralizing antibody titers. *Nature Medicine*. 26(6), 932-940. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0858-8>.
17. Angius, F., Iliaia, O., Amrani, A., Suisse, A., Rosset, L., Legrand, A., Miroux, B. (2018). A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins. *Scien Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26668-y>.
18. Antúnez Núñez, L. D. (2023). *Caracterización molecular de aislados de Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis de ovejas y cabras del estado de Jalisco* [Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autonoma del Estado de Mexico]. Repositorio Institucional Universidad Autonoma del Estado de Mexico. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/138900>.
19. Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J. R., Boisclair, J., Simard, C., y Bélanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive veterinary medicine*, 59(1-2), 67–81. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(03\)00060-6](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(03)00060-6).
20. ATCC, American Type Culture Collection. (2024). *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Buchanan) Ebersson 43926. <https://www.atcc.org/products/43926>.
21. Baird, G.J., y Fontaine, M.C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*, 137(4), 179-210. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.07.002>.
22. Baig, F., Fernando, L.P., Salazar, M.A., Powell, R.R., Bruce, T.F., Harcum, S.W. (2014). Dynamic transcriptional response of *Escherichia coli* to inclusion body formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(5), 980–999. <https://doi.org/10.1002/bit.25169>.
23. Baldauf, K. J., Royal, J. M., Hamorsky, K. T., Matoba, N. (2015). Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. *Toxins*, 7, 974–96. <https://doi.org/10.3390/toxins7030974>.
24. Baneyx, F., y Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>.
25. Baraúna, R. A., Ramos, R. T. J., Veras, A. A. O., de Sá, P.H.C.G., Guimarães, L. C., das Graças, D. A., Carneiro, A. R., Edman, J. M., Spier, S. J., Vasco, A., Silva, A. (2017). Genomic analysis of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Equi isolated from horses showing distinct signs of infection. *Standards in Genomic Sciences*, 12(16). <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0234-6>.
26. Barral, T. D., Mariutti, R. B., Arni, R. K., Santos, A. J., Loureiro, D., Sokolonski, A. R., Azevedo, V., Borsuk, S., Meyer, R., Portela, R. D. (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of Caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microbial Biotechnology*, 12(6), 1313-1323. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13454>.
27. Barral, T. D., Kalil, M. A., Mariutti, R. B., Arni, R. K., Gismene, C., Sousa, F. S., Collares, T., Seixas, F. K., Borsuk, S., Estrela-Lima, A., Azevedo, V., Meyer, R., Portela, R. W. (2022a). Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(24), 8035-8051. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12279-1>.
28. Barral, T.D., Rebouças, M.F., Loureiro, D., Raynal, J.T., Sousa, T.J., Moura-Costa, L.F., Azevedo, V., Meyer, R., Portela, R.W. (2022b). Chemokine production induced by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a murine model. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(2), 1019-1027. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00694-5>.

29. Barbosa, T. N., Ferreira, M. R. A., Scholl, N. R., Pegoraro, H. G., de Oliveira Silva, M. T., Sousa, F. S. S., Seixas, F. K., Collares, T. V., Leitte, F. L., de Pereira, C. M. P., Mansilla, A., y Borsuk, S. (2024). Iridaea cordata lipid extract associated with the rCP01850 protein of *C. pseudotuberculosis* elicited a Th1 immune response in immunized sheep. *Vaccine*, 42(23), 126220. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126220>.
30. Barrientos, P.J.S., García, G.D.A., Cuellar, O.J.A., y Garcia, V.S. (1996). Distribución de lesiones de linfadenitis caseosa en ovinos. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Brasil, 495, 252.
31. Bastos, B.L., Dias, P.R.W., Dorella, F.A., Ribeiro, D., y Seyffert, N. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *Journal of Clinical and Cellular Immunology*, 4, 1-15. <https://www.scrip.org/reference/referencespapers?referenceid=3204686>.
32. Belchior, S.E., Gallardo, A.A., Abalos, M.A., Alvarez, L.A., Núñez, N., Guevara, D.G., y Jensen, O. (2009). *Corynebacterium Pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revisión de casos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(10), 1-16. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617128018.pdf>.
33. Bartolomé, J., Roca, M.J., Marcote, E., Moreno, R. (1995). Adenitis por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en un pastor. *Medicina Clínica*. 104(18), 699-701. <https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/663149>.
34. Beisel, C.L., y Afroz, T. (2016). Rethinking the hierarchy of sugar utilization in bacteria. *Journal of Bacteriology*. 198(3), 374–376. <https://doi.org/10.1128/JB.00890-15>.
35. Bernard, K. (2012). The Genus *Corynebacterium* and Other Coryneform-Like Bacteria. Medically Relevant. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3152–3158. <https://doi.org/10.1128/JCM.00796-12>.
36. Bernard, K.A., y Funke, G. (2012). Genus *Corynebacterium*. En: Whitman, W.B. (Ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp.245–289). New York, USA: Springer.
37. Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-59. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>.
38. Bienick, M.S., Young, K.W., Klesmith, J.R., Detwiler, E.E., Tomek, K.J., Whitehead, T.A., Fong, S.S. (2014). The interrelationship between promoter strength, gene expression, and growth rate. *PLoS One*, 9(10), e109105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109105>.
39. Billington, S.J., Esmay, P.A., Songer, J., Jost, B., Hoppert, M., y Liebl, W. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 208(1), 41–45. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11058.x>.
40. Binns, S.H., Bailey, M., Green, L.E. (2002). Postal survey of ovine Caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Veterinary Record*, 150(9), 263-268. <https://doi.org/10.1136/vr.150.9.263>.
41. Blasius, A. L., y Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012>.
42. Blanco, A., y Blanco, G. (2017). Chapter 3 - Protein. *Medical Biochemistry*. Editorial Academic Press. 21-72. https://books.google.com.mx/books/about/Medical_Biochemistry.html?id=zGIIDQAAQBAJ&redir_esc=y.
43. Bobadilla-Soto, E.E., Flores-Padilla, J.P., y Perea-Peña, M. (2017). Comercio exterior del sector ovino mexicano antes y después del Tratado de Libre Comercio con América del Norte. *Economía y Sociedad*, 21(37), 35-49. <https://www.redalyc.org/journal/510/51054506003/>.
44. Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, 214, 149–160. <https://doi.org/10.1002/path.2287>.

45. Braga, W.U. (2007). Protection in alpacas against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using different bacterial components. *Veterinary Microbiology*, 119(2-4), 297-303. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.08.019>.
46. Brum, A.A., Silva, A.F.R., Silvestre, F.B., Collares, T., Begnine, K., Kommling, F., Veiras, T.(2017). Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. *Journal of Medical Microbiology*, 66, 635–642. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000477>.
47. Bretscher, P.A. (2014). On the Mechanism Determining the Th1/Th2 Phenotype of an Immune Response, and its Pertinence to Strategies for the Prevention, and Treatment, of Certain Infectious Diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*, 79, 361 – 376. <https://doi.org/10.1111/sji.12175>.
48. Brilhante-Bezerra, F. S., Thais de Oliveira-Silva, M., Silva-Rezende, A. F., Sena-Lopes, A., Barros-de Pinho, R., Kommling-Seixas, F., Veiras-Collares, T., Dias-Portela, R. W., Ariston de Carvalho-Azevedo, V., Borsuk, S. (2021). Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660, rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Vaccine*, 39 (18), 2568-2574. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.062>.
49. Bronte, V., Pittet, M.J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, 39(5), 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.010>.
50. Bruning-Fann, C., Balander, R., Garling, D. L., Kopcha, M. (2004). *Infectious diseases of meat animals | production diseases. Encyclopedia of Meat Sciences*. 656–664. <https://doi.org/10.1016/B0-12-464970-X/00025-8>.
51. Bryant, P., Ploegh, H. (2004). Class II MHC peptide loading by the professionals. *Current Opinion in Immunology*, 16, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.011>.
52. Brynjolfsson, S. F., Persson, B. L., Ekerhult, O. T., Rimkute, I., Wick, M. J., Martensson, I. L., Grimsholm, O. (2018). Long-lived plasma cells in mice and men. *Frontiers in Immunology*, 9, 2673. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02673>.
53. Burkovski, A. (2013). Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. *ISRN Microbiology*, 935736, 11. <https://doi.org/10.1155/2013/935736>.
54. Burkovski, A. (2018). The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(5), 717-725. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1036-6>.
55. Burrell, D. H. (1979). Conditions for in vitro haemolytic activity by *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Research in Veterinary Science*, 26(3), 333-338. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/42127/>.
56. Bush, R.D., Barnett, R., Links, I., y Windsor, P.A. (2012). Using abattoir surveillance and producer surveys to investigate the prevalence and current preventativemanagement of Caseous lymphadenitis in Merino flocks in Australia. *Animal Production Science*, 52, 675–679. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.03.023>.
57. Burmahan, A. y Brundage, C. M. (2021). Caseous lymphadenitis outbreak in a small ruminant herd. *Open Veterinary Journal*, 11(4), 530–534. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i4.2>.
58. Calabro, S., Liu, D., Gallman, A., Nascimento, M. S., Yu, Z., Zhang, T. T. (2016). Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Sub sets Tailors Adaptive Immunity. *Cell Reports*, 16(9), 2472–2485. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.076>.
59. Calcagno, C. y Dario, G. (2002). IMMSIM-C User's Guide 2002. https://www.researchgate.net/publication/265038170_IMMSIM-C_User%27s_Guide.
60. Carrasco, B., Garcia- de la Torre, J., Davis, K. G., Jones, S., Athwal, D., Walters, C. (2001). Crystallohydrodynamics for solving the hydration problem for multi-domain proteins: open physiological conformations for human IgG. *Biophysical Chemistry*, 93(2–3), 181–196. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(01\)00220-4](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(01)00220-4).
61. Carrillo, G., Ortega, S., y Hernandez, S. (2005). Prevalencia de Linfadenitis caseosa en hatos caprinos de la Comarca Lagunera de Durango. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 4, 51-56. <https://www.redalyc.org/pdf/4555/455545069013.pdf>.

62. Castiglione, F. y Bernaschi, M. (2004). C-ImmSim: playing with the immune response. – Katholieke Universiteit Leuven. https://www.researchgate.net/publication/228524051_C-ImmSim_playing_with_the_immune_response.
63. Cataldi, M., Vigliotti, C., Mosca, T., Cammarota, M., Capone, D. (2017). Emerging role of the spleen in the pharmacokinetics of mono clonal antibodies, nanoparticles and exosomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1249. <https://doi.org/10.3390/ijms18061249>.
64. Celli, S., Garcia, Z., Bousso, P. (2005). CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 202(9), 1271–1278. <https://doi.org/10.1084/jem.20051018>.
65. Chirino-Zarraga, C., Scamelli, A., y Rey-Valerion, C. (2005). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research*, 65, 170–175. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2005.06.017>.
66. Cetinkaya, B., Karahana, M., Atila, E., Kalina, R., De Baereb, T., y Vaneechoutte, M (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, 88, 75–83. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00089-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00089-5).
67. Chang, J., Wherry, E. y Goldrath, A. (2014). Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nature Immunology*, 15, 1104–1115. <https://doi.org/10.1038/ni.3031>.
68. Chau-Ching, L., John Ding, J., Young, E. (1998). Encyclopedia of Immunology (Second Edition). <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780122267659/encyclopedia-of-immunology#book-info>.
69. Coffman, R. L., Sher, A., y Seder, R. A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*, 29; 33(4): 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>.
70. Colom-Cadena, A., Velarde, R., Salinas, J., Borge, C., Garca-Bocanegra, I., Serrano, E., Gass, D., Bach, E. (2014). Management of a caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 83. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0083-x>.
71. Combs, D. J., y Lu, Z. (2015). Sphingomyelinase D inhibits store-operated Ca²⁺ entry in T lymphocytes by suppressing ORAI current. *Journal of General Physiology*, 146(2), 161–172. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511359>.
72. Correa, J.I., Stocker, A., Castro, S.T., Vale, V., Brito, T, Bastos, B. (2018). In vivo and in vitro expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. *AMB Express*, 8, 89. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0598-z>.
73. Costa, P. M., McCulloch, J. A., Almeida, S.S, Dorella, F. A., Fonseca, C.T., Oliveira, D.M., Teixeira, M.F.S. (2011). Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. *BMC Research Notes*, 4, 243. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-243>.
74. Costa, L., Maldonado, A., Huerta, B., Almeida, A. (2019). Optimization of a Conventional PCR Assay for the Identification of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* from Pyogenic Lesions. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 7(2), 201. <https://www.researchgate.net/publication/332950962>.
75. Dalsass, M., Brozzi, A., Medini, D., y Rappuoli, R. (2019). Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery. *Frontiers in Immunology*, 10, 113. . <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00113>.
76. Dalsgaard, K. (1974). Saponin adjuvants. 3. Isolation of a substance from Quillaja saponaria Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines. *Arch Gesamte Virusforsch*, 44(3), 243–254. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4365900/>.
77. Davis, I. D., Chen, W., Jackson, H., Parente, P., Shackleton, M., Hopkins, W., Chen, Q., Dimopoulos, N., Luke, T., Murphy, R. (2004). Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell

- responses in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10697–10702. <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.0403572101>.
78. De Baets, J., De Paepe, B., De Mey, M. (2024). Delaying production with prokaryotic inducible expression systems. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02523-w>.
79. Debien, E., Hélie, P., Buczinski, S., Leboeuf, A., Bélanger, D., y Drolet, R. (2013). Proportional mortality: A study of 152 goats submitted for necropsy from 13 goat herds in Quebec, with a special focus on caseous lymphadenitis. *The Canadian Veterinary Journal*, 54, 581–587. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24155449/>.
80. de Farias, A.E.M., Alves, J.R.A., Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Faccioli, M.P.Y., Lima, A.M.C. (2019). Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 51(4), 745–752. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1748-7>.
81. De Groot, A.S., Moise, L., Terry, F., Gutierrez, A.H., Hindocha, P., Richard, G., Hoft, D.F., Ross, T.M., Noe, A.R., Takahashi, Y., Kotraiah, V., Silk, S.E., Nielsen, C.M., Minassian, A.M., Ashfield, R., Ardito, M., Draper, S.J., Martin, W.D. (2020). Better epitope discovery, precision immune engineering, and accelerated vaccine design using immunoinformatics tools. *Frontiers in Immunology*, 11, 442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00442>.
82. Delgado, D.A., Zárraga, J., Chirino-Zárraga, C.I., y Carrero-Portillo, L.L. (2015). Caracterización epidemiológica de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Paraguaná, Venezuela. *Revista de Medicina Veterinaria*, 31, 35–45. <https://doi.org/10.19052/mv.3706>.
83. de Pinho, R.B., Barbosa, T.N., Dall'Agno, L., da Rocha- Fonseca, B., Bezerra, F.S.B., Sousa, F.S.S., Seixas, F.K., Collares, T., Borsuk, S. (2024). Mycobacterium bovis BCG expressing the proteins CP40 or CP09720 of *Corynebacterium pseudotuberculosis* promotes protection in mice after challenge. *Vaccine*, 42(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.11.049>.
84. de Pinho, R.B., de Oliveira-Silva, M.T., Bezerra, F.S.B., Borsuk, S. (2021a). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(6), 2287–2296. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11191-4>.
85. de Pinho, R.B., de Oliveira Silva M. T., Brenner G., Dié Alves M. S., Azevedo V., Dias Portela R., Borsuk S. (2021b). A novel approach for an immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection: An *Escherichia coli* bacterin expressing phospholipase D. *Microbial Pathogenesis*, 151, 104746. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104746>.
86. Devi, A., Chaitanya, N.S.N. (2021). In silico designing of multi-epitope vaccine construct against human coronavirus infections. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(18), 6903–6917. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1804460>.
87. Di Donato, A., Gambi, L., Ravaioli, V., Perulli, S., Cirasella, L., Rossini, R., Luppi, A., Tosi, G., Fiorentini, L. (2024). First Report of Caseous Lymphadenitis by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and Pulmonary Verminosis in a Roe Deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) in Italy. *Animals*, 14, 566. <https://doi.org/10.3390/ani14040566>.
88. Didierlaurent, A. M., Morel, S., Lockman L., Giannini, S. L., Bisteau, M., Carlsen, H., Kielland, A., Vosters, O., Vanderheyde, N., Schiavetti, F., Larocque, D., Van Mechelen, M., Garçon, N. (2009). AS04, an aluminum salt-and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *The Journal of Immunology*, 183, 6186–6197. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901474>.
89. Dileepan, T., Malhotra, D., Kotov, D.I. Dmitri, I. K., Kolawole, E. M., Krueger, P. D., Evavold, B. D., y Jenkins, M. K. (2021). MHC class II tetramers engineered for enhanced binding to CD4 improve detection of antigen-specific T cells. *Nature Biotechnology*, 39, 943–948. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00893-9>.
90. Dorella, F.A., Pacheco, L.G., Oliveira S.C., Miyoshi, A., y Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary research*, 37(2), 201–218. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005056>.

91. Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., Portela, R. W., Meyer, R., Miyoshi, A., y Azevedo, V. (2009). Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 8, 205–213. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.2.205>.
92. Droppa-Almeida, D., Vivas, W.L., Silva, K.K., Rezende, A.F., y Simionatto, S. (2016). Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine*, 34 (8), 1091–1096. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.064>.
93. Droppa-Almeida, D., Franceschi, E., Ferreira, F.P. (2018). Immune-informatic analysis and design of peptide vaccine from multi-epitopes against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bioinformatics and Biology Insights*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.1177/1177932218755337>
94. Droppa-Almeida, D., Wanessa L.P., Fraga, R. E., Rezende, A. F. S., Alves, L. L., Meyer, R., Lima-Verde, I.B., Delagostin, O., Borsuk, S., Padilha, F.F. (2019). Response with TH1 profile obtained in vaccine formulation against Caseous Lymphadenitis in animal model C57 Black/6. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 192-196. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.11.002>.
95. Droppa-Almeida, D., da Silva, G. A., Gaspar, L.M.Dac., Pereyra, B.B.S., Nascimento, R.J.M., Borsuk, S. (2021). Peptide vaccines designed with the aid of immunoinformatic against Caseous Lymphadenitis promotes humoral and cellular response induction in mice. *PLoS ONE*, 16(11), e0256864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256864>.
96. Dukkupati, V.S.R., Blair, H.T., Garrick, D.J., y Murray, A. (2006). Ovar-Mhc — Ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases, *New Zealand Veterinary Journal*, 54(4), 153-160. <https://doi.org/10.1080/00480169.2006.36689>.
97. Dupuis, M., Murphy, T.J., Higgins, D., Ugozzoli, M., van Nest, G., Ott, G., McDonald, D.M. (1998). Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunology*, 186, 18–27. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1283>.
98. Eastwood, T.A., Baker, K., Streather, B.R., Allen, N., Wang, L., Botchway, S.W., Brown, I.R., Hiscock, J.R., Lennon, C., Mulvihill, D.P. (2023). High-yield vesicle-packaged recombinant protein production from *E. coli*. *Cell Reports Methods*. 3(2), <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100396>.
99. Eggleton, D.G., Haynes, J.A., Middleton, H.D., Cox, J.C. (1991). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 68(10), 322-325. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03088.x>.
100. El-Enbaawy, M.I., Saad, M.M., y Selim, S.A. (2005). Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Egyptian Journal of Immunology*, 12(2), 13-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17977206/>.
101. El Damaty, H. M., El-Demerdash, A. S., Abd El-Aziz, N. K., Yousef, S. G., Hefny, A. A., Abo-Remela, E. M., Shaker, A., y Elsohaby, I. (2023). Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibilities of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated from Caseous Lymphadenitis of Smallholder Sheep and Goats. *Animals*, 13(14), 2337. <https://doi.org/10.3390/ani13142337>
102. Elzey, B.D., Tian, J., Jensen, R.J., Swanson, A.K., Lees, J.R., Lentz, S.R., Stein, C.S., Nieswandt, B., Wang, Y., Davidson, B.L., y Ratliff, T.L. (2003). Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*, 19(1), 9-19. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00177-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00177-8).
103. Estavaio, B.S., Gallardo, A., Abalo, A., Jodor, N., y Jensen, O. (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Revista Veterinaria Argentina*, 23, 258-278. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/ovinos/01-linfadenitis_caseosa.pdf.

104. Estevao, S., Gallardo, A., Ábalos, A., Díaz, Y., Álvarez, L., y Callejo, R. (2007). Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 39, 44-46. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412007000100011.
105. Faeza, N.M.N., Jesse, F.F.A., Hambal, I.U., Odhah, M.N., Umer, M., y Wessam, M.M.S. (2019). Responses of testosterone hormone concentration, semen quality, and its related pro-inflammatory cytokines in bucks following *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its mycolic acid infection. *Tropical Animal Health and Production*, 51 (7), 1855-1866. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01878-2>.
106. Fathallah, A.M., Bankert, R.B., Balu-Iyer, S.V. (2013). Immunogenicity of subcutaneously administered therapeutic proteins—a mechanistic perspective. *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, 15(4), 897–900. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9510-6>.
107. Fazren, A., Ahmad-Fuaad, A. A. H., Skwarczynski, M., y Toth, I. (2014). Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10, 778–796. <https://doi.org/10.4161/hv.27332>.
108. Fernandez-Tejada, A., Tan, D. S., y Gin, D. Y. (2016). Development of Improved Vaccine Adjuvants Based on the Saponin Natural Product QS-21 through Chemical Synthesis. *Accounts of Chemical Research Journal*, 49, 1741–1756. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00242>.
109. Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A., y Flieger, A. (2016). Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as virulence factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 597-628. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00082-15>.
110. Flores Pérez, G. (2023). *Aislamiento e identificación molecular de Corynebacterium Pseudotuberculosis biovar ovis obtenidos de lesiones abscedativas superficiales en corderos del Estado de Jalisco, México* [Tesis Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia., Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM AMECAMECA]. Repositorio Institucional Universidad Autonoma del Estado de Mexico. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/138896>.
111. Fontaine, M.C., Baird, G., Connor, K.M., Rudge, K., Sales, J., y Donachie, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24, 5986–5996. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.005>.
112. Fontaine, M. (2015). Caseous lymphadenitis in sheep. *The Moredun Foundation News Sheet* 6(5). <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:31272268>.
113. Förster, R., Braun, A., Worbs, T. (2012). Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunology*, 33(6), 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.007>.
114. Fritz, J.H., Le- Bourhis, L., Sellge, G., Magalhaes, J.G., Fsihi, H., Kufer, T.A., Collins, C., Viala, J., Ferrero, R.L., Girardin, S.E., Philpott, D.J. (2007). Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*, 26, 445–459. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.009>.
115. Fu, M., Xu, X., Cheng, Z., Zhu, J., Sun, A., Xu, G., An, X. (2022). Combined Transcriptomic and Proteomic of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in the Spleen of Dairy Goats. *Animals (Basel)*, 12(23), 3270. <https://doi.org/10.3390/ani12233270>.
116. Furman, D., y Davis, M. M. (2015). New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. *Vaccine*, 33(40), 5271–5281. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.117>.
117. Gallardo, A., Toledo, R.A., González- Pasayo, R.A., Azevedo, V., Robles, C., Paolicchi, F.A., y Estevao- Belchior S. (2019). *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis evaluación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 334-338. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.12.001>.

118. Galvão, C.E., Perdigão, P.F., de Oliveira, C.E., Forner, O., Ribeiro, R.B.P., Oliveira, C.S., y Soares, G.M.R., (2017). Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. *BMC Microbiology*, 17, 202. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1110-7>.
119. Gangloff, S.C., Zähringer, U., Blondin, C., Guenounou, M., Silver, J., Goyert, S. M. (2005). Influence of CD14 on ligand interactions between lipopolysaccharide and its receptor complex. *Journal Immunology*, 175(6), 3940–3945. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3940>.
120. Gao, H., Ma, Y., Shao, Q., Hong, Q., Zheng, G., y Li, Z. (2018). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain KM01, isolated from the abscess of a goat in Kunming, China. *Genome Announcements*, 6(11), e00013-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00013-18>
121. García, P.C. (2017). *Evaluación de un inmunógeno para el control de Corynebacterium pseudotuberculosis en ovinos* [Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional Universidad Autónoma del Estado de México. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/68375>.
122. Garcillán, B., Megino, R.F., Herrero-Alonso, M., Guardo, A.C., Perez-Flores, V., Juraske, C., Idstein, V., Martin-Fernandez, J.M., Geisler, C., Schamel, W.W.A., Marin, A.V., Regueiro, J.R. (2022). The role of the different CD3 γ domains in TCR expression and signaling. *Frontiers in Immunology*, 13, 978658. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.978658>.
123. Gary, K. (2024). *Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Chapter 12.3. Community College of Baltimore Country (Cantonsville)*. https://cwoer.ccbcmd.edu/science/microbiology/index_gos.html.
124. Gavin, A.L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B., Nemazee, D. (2006). Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science*, 314, 1936–1938. <https://doi.org/10.1126/science.1135299>.
125. Gerner, M.Y., y Mescher, M.F. (2009). Antigen processing and MHC-II presentation by dermal and tumor-infiltrating dendritic cells. *Journal of Immunology*. 182(5), 2726–2737. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803479>.
126. Giannini, G., Rappuoli, R., Ratti, G. (1984). The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic Acids Res.* 12, 4063–4069. <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4063>.
127. González, A., y Fillat, M.F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*, 37(1), 14-27. <https://www.researchgate.net/publication/335159297>
128. Guimarães, A.S., Seyffer, N., Bastos, B.L., Portela, R.W.D., Carmo, F.B., Meyer, R., Azevedo, V., y otros. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Ruminant Research*, 87, 86–91. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2009.09.027>
129. Guimarães, A.S., Carmo, F.B., Heinemann, M.B., Portela, R.W.D., Meyer, R., Andrey, P.L., Núbia, N. (2011). High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 7, 68. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-68>.
130. Haralampidis, K., Trojanowska, M., Osbourn, A.E. (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 75, 31–49. https://doi.org/10.1007/3-540-44604-4_2.
131. Haynes, J.A., Tkalcovic, J., Nisbet, I.T. (1992). Production of an enzymatically inactive analog of phospholipase D from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Gene*. 119(1), 119-121. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90075-z](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90075-z).
132. He, J.S., Subramaniam, S., Narang, V., Srinivasan, K., Saunders, S.P., Carbajo, D., Wen-Shan, T., Hidayah- Hamadee, N., Lum, J., Lee, A. (2017). IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nature Communications*. 8(1), 641. <https://dr.ntu.edu.sg>

133. Heggelund, L., Gaustad, P., Håvelsrud, O.E., Blom, J., Borgen, L., Sundset, A., Sorum, H., y Froland, S.S. (2015). *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(2), ofv053. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv053>.
134. Hey, Y.Y., O'Neill, H.C. (2012). Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 16(11), 2611–2619. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01608.x>.
135. Hillier, C.J., Ware, L.A., Barbosa, A., Angov, E., Lyon, J.A., Heppner, D.G., Lanar, D.E. (2005). Process development and analysis of liver-stage antigen 1, a preerythrocyte-stage protein-based vaccine for *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 73, 2109–2115. <https://doi.org/10.1128/iai.73.4.2109-2115.2005>.
136. Hodgson, A. L. M., Bird, P., y Nisbett, I. T. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 172, 1256–1261. <https://doi.org/10.1128/jb.172.3.1256-1261.1990>.
137. Hodgson, A.L.M., Krywult J., Corner L.A., Rothel J.S., y Radford A.J. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infection and Immunity*, 60(7), 2900-2905. <https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2900-2905.1992>
138. Hodgson, A.L.M., Tachedjian, M., Corner, L.A., y Radford, A. J. (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, 62(12), 5275-5280. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.12.5275-5280.1994>.
139. Hodgson, A.L., Moore, R.J., Rothel, L., Krywult, J., Radford, A.J., y Lund, K. (1999). Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine*, 18, 487-497. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)00264-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00264-3).
140. Hsu, T.Y., Renshaw, H.W., Livingston, C.W., Augustine, J.L., Zink, D.L., Gauer, B.B. (1985). *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxin: fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. *American Journal of Veterinary Research*, 46(5), 1206-1211. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=3732055>.
141. Hume, D.A. (2008). Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunology*, 1(6), 432–441. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.36>.
142. Hwang, S.T. (2012). Homeward bound: how do skin dendritic cells find their way into the lymph system? . *Journal of Investigative Dermatology*, 132(4), 1070–1073. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.39>.
143. Ibraim, I.C., Dornelles, Parise, M.T., Parise, D., Tadra, M.Z., de Paula, T.L., Wattam, A.R. (2019). Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation. *BMC Genomics*, 20, 663. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6018-1>.
144. Itano, A. A., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*, 19(1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00175-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00175-4).
145. Ishaq, Z., Zaheer, T., Waseem, M., Shahwar Awan, H., Ullah, N., AlAsmari, A. F., Ali, A. (2023). Immunoinformatics aided designing of a next generation poly-epitope vaccine against uropathogenic *Escherichia coli* to combat urinary tract infections. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 42(21), 11976–11996. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2266018>.
146. Jakubzick, C.V., Randolph, G.J., Henson, P.M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, 17, 349–362. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.28>.

147. Jefferis, R., y Kumararatne, D.S. (1990) Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clinical and Experimental Immunology*, 81(3), 357–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05339.x>.
148. Jennings, G.T., Bachmann, M.F. (2009). Immunodrugs: Therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, 303–326. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-061008-103129>.
149. Jensen, P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nature Immunology*, 8, 1041–1048. <https://doi.org/10.1038/ni1516>.
150. Jesse, F.F.A., Odhah, M.N., Abbad, Y., Garba, B., Mahmood, Z., Hambali, I.U., Haron, A.W. (2020). Responses of female reproductive hormones and histopathology in the reproductive organs and associated lymph nodes of Boer does challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic corynomycolic acid Extract. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103852. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.038>.
151. Jesse, F.F.A., P.S.S. Randolph, A.A. Saharee, A.H. Wahid and M. Zamri-Saad. (2013). Clinicopathological response of mice following oral route infection of *C. pseudotuberculosis*. *Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 2, 38–42. <https://doi.org/10.9790/2380-0223842>.
152. Jorge, S., y Dellagostin, O.A. (2017). The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, 1, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.001>.
153. Kabashima, K., Shiraishi, N., Sugita, K., Mori, T., Onoue, A., Kob, ayashi. (2007). CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *The American Journal of Pathology*, 171(4), 1249–1257. <https://doi.org/10.2353/ajpat.h.2007.07022> 5. 95.
154. Kashem, S.W., Hanifa, M., Kaplan, D.H. (2017). Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 469–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052215>. 34.
155. Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441, 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature04734>.
156. Keegan, A.D., Leonard, W.J., Zhu, J. (2021). Recent advances in understanding the role of IL-4 signaling. *Faculty Reviews*, 10, 71. <https://doi.org/10.12703/r/10-71>.
157. Kensil, C.R., Patel, U., Lennick, M., Marciani, D. (1991). Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex. *Journal of Immunology*, 146(2), 431–437. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1987271/>.
158. Khamis, A., D. Raoult, y La Scola, B. (2004). *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3925–3931. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.3925-3931.2004>.
159. Khamis, A., Raoult, D., y La Scola, B. (2005). Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1934–1936. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1934-1936.2005>.
160. Khan, U., y Ghazanfar, H. (2018). T Lymphocytes and Autoimmunity. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 341, 125–168. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.008>.
161. Khanamir, R. A., Issa, N. A., y Abdulrahman, R. F. (2023). First study on molecular epidemiology of caseous lymphadenitis in slaughtered sheep and goats in Duhok Province, Iraq. *Open Veterinary Journal*, 13(5), 588–598. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2023.v13.i5.11>
162. Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., Hiepe, F. (2019). The maintenance of memory plasma cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 721. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00721>.
163. Kim, S., Oh, D.B., Kwon, O., Kang, H.A. (2010). Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. *The Journal of Biochemistry*, 147(4), 523–533. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp198>.
164. Kim, A., Boronina, T.N., Cole, R.N., Darrah, E., Sadegh-Nasseri, S. (2017). Distorted Immunodominance by Linker Sequences or other Epitopes from a Second Protein Antigen During Antigen-Processing. *Scientific Reports*, 7, 46418. <https://doi.org/10.1038/srep46418>

165. Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L. (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity*, 29(3), 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.013>.
166. Kobayashi, H., Horner, A.A., Takabayashi, K., Nguyen, M.D., Huang, E., Cinman, N., Raz, E. (1999). Immunostimulatory DNA pre-priming: A novel approach for prolonged Th1-biased immunity. *Cellular Immunology*, 198, 69–75. <https://doi.org/10.1006/cimm.1999.1572>.
167. Köllisch, G., Kalali, B.N., Voelcker, V., Wallich, R., Behrendt, H., Ring, J. (2005). Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, 114, 531–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02122.x>.
168. Franken, L., Schiwon, M., Kurts, C. (2016). Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cell Microbiology*, 18(4), 475–487. <https://doi.org/10.1111/cmi.12580>.
169. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
170. Landmann, R., Müller, B., Zimmerli, W. (2000). CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes and Infection*, 2(3), 295–304. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00298-7](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00298-7).
171. Langova, D., Slana, I., Okunkova, J., Moravkova, M., Florianova, M., Markova, J. (2022). First Evidence of the Presence of the Causative Agent of Caseous Lymphadenitis—*Corynebacterium pseudotuberculosis* in Dairy Products Produced from the Milk of Small Ruminants. *Pathogens*, 11, 1425. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121425>.
172. Lau, A.J., Woo, S.O., Koh, H.L. (2003). Analysis of saponins in raw and steamed Panax notoginseng using high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1011, 77–87. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)01135-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)01135-x).
173. Leal, K. S., Silva, T.O., Silva, A.F.R., Brilhante, F.S.B., Begnini, K., Seixas, F., Collares, T. (2018). Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine*, 36, 3578–3583. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.049>.
174. Lee, W., y Suresh, M. (2022). Vaccine adjuvants to engage the crosspresentation pathway. *Frontiers in Immunology*, 13, 940047. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940047>.
175. Levin, C., Bonduelle, O., Nuttens, C., Primard, C., Verrier, B., Boissonnas, A. (2017). Critical role for skin-derived migratory DCs and Langerhans cells in TFH and GC responses after intradermal immunization. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(9), 1905–1913. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.04.016>.
176. Lewis, S.M., Williams, A., Eisenbarth, S.C. (2019). Structure and function of the immune system in the spleen. *Science Immunology*, 4(33), eaau6085. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>.
177. Li, H., Nookala, S., y Re, F. (2007). Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *The Journal of Immunology*, 178, 5271–5276. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5271>.
178. Li, H., Yang, H., Zhou, Z., Li, X., Yi, W., Xu, Y., Wang, Z.. (2018a). Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*, 168, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.09.015>.
179. Li, S.S., Li, Y., Long, N., Jiang, F., y Zhang, R. (2018b). Highly active and stable nanobiocatalyst based on in-situ cross-linking of phospholipase D for the synthesis of phosphatidylserine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 1188–1194. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.041>.
180. Listos, P., Gryzinska, M., Martychiewicz, M., Pointing, S., Barton, A., y Dylewska, M. (2016). Caseous Lymphadenitis in Sheep in the Falkland Islands. *Acta Veterinaria*, 66(3), 406–412. <https://doi.org/10.1515/acve-2016-0034>.
181. Longhi, M.P., Trumpfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., Salazar, A.M., Colonna, M., Steinman, R.M. (2009). Dendritic cells require a systemic type I interferon response

- to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 1589–1602. <https://doi.org/10.1084/jem.20090247>.
182. Lorent, J., Lins, L., Domenech, Ö., Quetin-Leclercq, J., Brasseur, R., and Mingeot-Leclercq, M. P. (2014). Domain formation and permeabilization induced by the saponin α -hederin and its aglycone hederagenin in a cholesterol-containing bilayer. *Langmuir*, 30, 4556–4569. <https://doi.org/10.1021/la4049902>.
183. Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., Xia, B. (2012). CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>.
184. Mahmood, Z.K.H., Jesse, F.F., Saharee, A.A., Jasni, S., Yusoff, R., y Wahid, H. (2015). Clinico-pathological changes in goats challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (PLD). *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 10 (3), 112-132. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.655-661>.
185. Malissen, B., Tamoutounour, S., Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 417–428. <https://doi.org/10.1038/nri3683>.
186. Malito, E., Bursulaya, B., Chen, C., Lo Surdo, P., Picchianti, M., Balducci, E. (2012). Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 109, 5229–5234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201964109>.
187. Maraskovsky, E., Schnurr, M., Wilson, N.S., Robson, N.C., Boyle, J., Drane, D. (2009). Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunology & Cell Biology*, 87, 371– 376. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.21>
188. Martin, M.D., y Badovinac, V.P. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Frontiers in Immunology*, 9, 2692. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02692>
189. Marshall, J.D., Higgins, D., Abbate, C., Yee, P., Teshimam G., Ott, G., dela Cruz, T., Passmore, D., Fearon, K.L., Tuck, S., Van- Nest, G. (2004). Polymyxin B enhances ISS-mediated immune responses across multiple species. *Cell Immunology*, 229, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2004.04.009>.
190. Massena, S., Christoffersson, G., Hjertström, E., Zcharia, E., Vlodavsky, I., Ausmees, N., Rolny, C., Li, J.P., Phillipson, M. (2010). A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood*, 116, 1924 –1931. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-266072>.
191. Matloubian, M., Concepcion, R.J., y Ahmed, R. (1994). CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of Virology*, 68(12), 8056-8063. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.12.8056-8063.1994>.
192. McKean, S.C., Davies, J.K., y Moore, R.J. (2007). Expression of phospholipase D the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/005926-0>.
193. McLennan, D.N., Porter, C.J., Charman, S.A. (2005). Subcutaneous drug delivery and the role of the lymphatics. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.05.006>.
194. Medrano, G., Hung A.Ch., Alvarado A.S., y Li E.O. (2003). Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 14(1), 61-67. <https://siis.unmsm.edu.pe/es/publications/evaluaci%C3%B3n-de-una-vacuna-contracorynebacterium-pseudotuberculosis>.
195. Meng, W., Chen, S., Huang, L., Yang, J., Zhang, W., Zhong, Z., Zhou, Z., Liu, H., Fu, H., He, T. y Peng, G. (2023). Isolation, characterization, and pathogenicity assessment of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strains from alpacas (*Vicugna pacos*) in China. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1206187. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1206187>.
196. Menon, A.P., Moreno, B., Meraviglia-Crivelli, D., Nonatelli, F., Villanueva, H., Barainka, M., Zheleva, A., van Santen, H.M., Pastor, F. (2023). Modulating T Cell Responses by Targeting CD3. *Cancers (Basel)*. 15(4), 1189. <https://doi.org/10.3390/cancers15041189>.

197. Menzies, P.I., Hwang, Y-T., Prescott, J.F. (2004). Comparison of an interferon- γ a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*, 100, 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.012>.
198. Mondragón, A.J, Domínguez-Vara, I.A., Rebollar, R.S., Borques, G.J.L., y Hernández, M.J. (2010). Canales de comercialización de la carne de ovino en Capulhuac Estado de México. En: Cavallotti VBA, Marcof ACF y Cesin VA. *Los grandes retos de la ganadería: hambre, pobreza y crisis*. UACH-CP, México, 341-349.
199. Moreira, L.S., Lopes, N.D.R., Pereira, V.C., Andrade, C.L.B., Torres, A.J.L., Ribeiro, M.B., Freire, S.M., Santos, R.M.D., D'ávila, M., Nascimento, R.M., Marchioro, S.B. (2022). The Association of Bacterin and Recombinant Proteins Induces a Humoral Response in Sheep against Caseous Lymphadenitis. *Vaccines (Basel)*, 10(9), 1406. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091406>.
200. Moreira, L.D.O., Andrade, A.F.B., Vale, M.D., Souza, S.M.S., Hirata, R., Asad, L.M.O.B., Asad, N.R., Monteiro-Leal, L.H., Previato, J.O., Mattos-Guaraldi, A.L. (2003). Effects of Iron Limitation on Adherence and Cell Surface Carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 69. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5907-5913.2003>.
201. Moussa, I.M., Mohamed, S.A., Ashgan, M., Hessain, S.A., Kabli, E., Hassan, A.H., Salha, A.S. (2016). Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 718–723. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.06.005>.
202. Moura-Costa, Bahia, L.F., Carminati R., Vale V.L.C., Paule B.J.A., Portela, R.W., Freire, Nascimento, S.M.I., Schaer, R., Barreto, L.M.S., Meyer R. (2008). Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126 (1-2), 131-141. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.06.013>.
203. Muckle, C.A., y Gyles, C.L. (1986). Exotoxic activities of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Current Microbiology*, 13, 57–60 (1986). <https://doi.org/10.1007/BF01568281>.
204. Muller, B., de Klerk-Lorist, L.M., Henton, M.M., Lane, E., Parsons, S., Gey van Pittius, N.C., Kotze, A., van Helden, P.D., y Tanner, M. (2011). Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Veterinary Microbiology*, 147, 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.017>.
205. Muñoz, B.A.V., Cortés, P.Y.A., Arellano, R.B., Hernández, G.M., Hernández, C.R., y Díaz, A.E. (2016). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from muscular abscesses in two horses: first report in Mexico. *Equine Veterinary Education*, 29(8), 431-435. <https://doi.org/10.1111/eve.12585>.
206. Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi D.V., y Arni, R.K. (2005). Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of Sphingomyelinases D. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13658–13664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412437200>.
207. Murguía, O.M.L., y Morales, A.J.F. (2017). *Control y prevención de la linfadenitis caseosa en ovinos*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Campo Experimental Mocochoá. Folleto para productores. Núm. 7. Mérida, Yucatán, México. 20 p.
208. Musvosvi, M., Huang, H., Wang, C., Xia, Q., Rozot, V., Krishnan, A., Acs, P., Cheruku, A., Obermoser, G., Leslie, A., Behar, S. M., Hanekom, W. A., Bilek, N., Fisher, M., Kaufmann, S. H. E., Walzl, G., Hatherill, M., Davis, M.M., Scriba, T. J. (2023). T cell receptor repertoires associated with control and disease progression following *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature Medicine*, 29, 258–269. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02110-9>.

209. Nakajima, S.M.D., Igyártóm B.Z.P., Honda, T.M.D.P., Egawa, G.M.D.P., Otsuka, A.M.D.P., Hara-Chikuma, M.P. (2012). Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 1048-1055. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.063>.
210. Nassar, A.F.C., Daniel, G.T., Miyashiro, S., Ruiz, R., Scannapieco, E.M., de Souza, J., y Gregory, L. (2015). Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, 1-6. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000692013>.
211. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. The 3Rs. (2022). *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*. <https://nc3rs.org.uk/>.
212. National Research Council. (2017). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals -- Spanish Version*. Washington, DC: The National Academies Press. National Research Council; Division on Earth and Life Studies; Commission on Life Sciences; Institute for Laboratory Animal Research <https://doi.org/10.17226/10929>.
213. Natoli, G., Ostuni, R. (2019). Adaptation and memory in immune responses. *Nature Immunology*, 20, 783–792. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0399-9>.
214. Neumann, W., Gulati, A., Nolan, E.M. (2016). Metal homeostasis in infectious disease: recent advances in bacterial metallophores and the human metal-withholding response. *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 0-18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa>.
215. Nielsen, M.C., Andersen, M.N., Møller, H.J. (2019). Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro. *Immunology*, 159(1), 63-74. <https://doi.org/10.1111/imm.13125>.
216. Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014: Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-033-sag-zoo-2014-metodos-para-dar-muerte-a-los-animales-domesticos-y-silvestres>.
217. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994: Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. <https://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>.
218. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994: Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0.
219. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>.
220. Ochoa, U.G., Deuces, I.J., Martínez, L.P., Jiménez, B.M.R., y Pérez, R.M. (1996). Aislamiento de agentes bacterianos a partir de exudados nasales en rebaños ovinos trashumantes de Xalatlaco México. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Brasil, PN9. 12909, 230.
221. Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., Yoshikawa, M. (2000). Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Journal of Biological Chemistry*, 381(1), 67–74. <https://doi.org/10.1515/BC.2000.009>.
222. Odhah, M.N., Abdullah, F.F.J., Haron, A.W., Mohd, L.M.A., Zamri SM, Khuder, Z. (2017). Hemogram responses in goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogen mycolic acids. *Veterinary World*, 10(6), 655-661. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.655-661>.
223. Odhah, M.N., Jesse, F.F.A., Lawan, A., Idris, U.H., Marza, A.D., Mahmood, Z.K. (2018). Responses of haptoglobin and serum amyloid A in goats inoculated intradermally with *C. pseudotuberculosis* and mycolic acid extract immunogen. *Microbial Pathogenesis*, 117, 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.038>. E
224. Odhah, M.N., Jesse, F.F.A., Teik, C.E.L., Mahmood, Z., Wahid, H.A., Mohd, L.M.A. (2019). Clinico-pathological responses and PCR detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its

- immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103628. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103628>.
- 225.OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Informe del grupo ad hoc de la OIE sobre las enfermedades prioritarias para las cuales las vacunas pueden reducir el uso de agentes antimicrobianos en bovinos, ovejas y cabras. Paris. Recuperado de <http://www.oie.int/fileadmin/SST/adhocreports/AHG>.
- 226.Oliveira, M., Barroco, C., Mottola, C., Santos, R., Lemsaddek, A., Tavares, L., y Semedo-Lemsaddek, T. (2014). First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *Veterinary Research*, 10, 218. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0218-3>.
- 227.Oliveira, A., Teixeira, P., Azevedo, M., Jamal, S.B., Tiwari, S., Almeida, S., Silva, A., Barh, D., Dorneles, E.M.S., Haas, D.J., Heinemann, M.B., Ghosh, P., Pereira, A., Figueiredo, H., Ferreira, R.S., Azevedo, V. (2016). *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under anagenesis and biovar Equi forms biovar Ovis: a phylogenetic inference from sequence and structural analysis. *BMC Microbiology*, 16, 100. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0717-4>.
- 228.Oliveira, A., Oliveira, L.C., Aburjaile, F., Benevides, L., Tiwari, S., Jamal, S.B., Silva, A. (2017a). Insight of genus *Corynebacterium*: Ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1937. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01937>
- 229.Oliveira, A., Teixeira, P., Barh, D., Barh, D., Ghosh, P., y Azevedo, V. (2017b). Key amino acids in understanding evolutionary characterization of Mn/Fe-Superoxide dismutase: A phylogenetic and structural analysis of proteins from *Corynebacterium* and Hosts. *The Scientific pages of Artificial Intelligence*, 1(1), 1-11. <https://doi.org/10.36959/643/298>.
- 230.Ouyang, W., O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50(4), 871-891. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>.
- 231.Pacheco, L.G.C., Pena, R.R., Castro, T.L.P., Dorella, F.A., Bahia, R.C., Carminati, R., Frota, M.N.L. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 480-486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46997-0>.
- 232.Pacheco, L.G.C, Slade, S.E, Seyffert, N., Santos, A.R., y Castro, T.L.P. (2011). A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiology*, 11, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-12>.
- 233.Pacheco, L.G.C, Castro, T.L.P., Carvalho, R.D., Moraes, P.M., Dorella, F.A., Carvalho, N.B., Slade, S.E., y otros. (2012). A role for sigma factor σ in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/peroxid stress. *Frontiers Microbiology*, 3, 126. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00126>
- 234.Palatnik de Sousa, C.B., Santos, W.R., Casas, C.P., Paraguai- de Souza, E., Tinoco, L.W., da Silva, B.P. (2004). Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* saponins. *Vaccine*, 22(19), 2470–2479. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.072>.
- 235.Panda, S., Morgan, J., Cheng, C. *et al.* Identification of differentially recognized T cell epitopes in the spectrum of tuberculosis infection. *Nature Communications*, 15, 765. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45058-9>.
- 236.Parise, D., Parise, M., Viana, M.V.C., Muñoz, B.A.V., Cortés-Pérez, Y.A., Azevedo, V. (2018). First genome sequencing and comparative analyses of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains from Mexico. *Stand in Genomic Science*, 13(21). <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0325-z>.
- 237.Park, G.S., Lee, S., Jeong, M.A., Lee, S.Y., Cho, D.G., Cho, W., Kim, S.C., Kim, H.J., Lee, T.G., Jeong, C.G. (2024) . First Trial of a Novel Caseous Lymphadenitis Inactivated Vaccine in South

- Korea: Experimental Evaluation across Various Animal Models. *Pathogens*, 13, 729. <https://doi.org/10.3390/pathogens13090729>.
238. Parkin, J., y Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777-1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7).
239. Pascual, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A., Gimenez, M.N., y Collins, M.D. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *International journal of Systematic Bacteriology*, 45, 724-728. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-724>.
240. Passante, E. (2020). Mast Cell and Basophil Cell Lines: A Compendium. *Methods in Molecular Biology*, 2163, 127-144. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0696-4_10.
241. Paton, M.W., Rose, I.R., Hart, R.A., Sutherland, S.S., Mercy, A.R., Ellis, T.M. (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Australian Veterinary Journal*, 71, 47-49. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb06152.x>.
242. Paton, M.W., Sutherland, S.S., Rose, I.R., Hart, R.A., Mercy, A.R., y Ellis, T.M. (1995). The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. *Australian Veterinary Journal*, 72, 266-269. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1995.tb03542.x>.
243. Paton, M.W., Walker, S.B., Rose, I.R., y Watt, G.F. (2003). Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Veterinary Journal*, 81(1-2), 91-95. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2003.tb11443.x>.
244. Paule, B.J.A., Azevedo, V., Regis, L.F., Carminati, R., y Bahia, R. (2003). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96, 129-139. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00146-6).
245. Paule, B. J., Meyer, R., Moura-Costa, L.F., Bahia, R.C., Carminati, R., y Regis, L.F. (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction / concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, 34, 311-16. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.12.003>.
246. Peel, M.M., Palmer, G.G., Stacpoole, A.M., y Kerr, T.G. (1997). Human Lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and Review. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 185-91. <https://doi.org/10.1093/clinids/24.2.185>.
247. Perkins, S.L., Magdesian, K.G., Thomas, W.P., y Spier, S.J. (2004). Pericarditis and pleuritis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(7), 1133-1138. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.1133>.
248. Peters, B., Nielsen, M., Sette, A. (2020). T Cell Epitope Predictions. *Annual review of immunology*, 38, 123-145. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-082119-124838>.
249. Phimister, E.G., y Germain, R. N. (2019). The Cellular Determinants of Adaptive Immunity. *New England Journal of Medicine*, 381, 1083-1085. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1909387>.
250. Pinto-Gomide, A.C., Gomes de Sá, P., Queiroz, A.L., Sousa, T., Rodrigues, L., Juca, R., Azevedo, V. (2018). Heat shock stress: Profile of differential expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi. *Gene*, 645, 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.015>.
251. Pointon, A., Hamilton, D., y Kiermeier, A. (2019). Comparison of postmortem inspection procedures for detecting caseous lymphadenitis of Australian sheep and goats. *The Veterinary Record*, 185(2), 54. <https://doi.org/10.1136/vr.105353>.
252. Prygiel, M., Mosiej, E., Polak, M., Krysztopa-Grzybowska, K., Wdowiak, K., Formińska, K., Zasada, A.A. (2024). Challenges of Diphtheria Toxin Detection. *Toxins*, 16, 245. <https://doi.org/10.3390/toxins16060245>.
253. Radostis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., y Hinchcliff, K.W. (2000). Caseous lymphadenitis in sheep and goats. En: Saunders, W.B. (Ed.) *Veterinary Medicine* (p. 727-730). London, England.

254. Ramos- Calcina, A., Villasante-Saravia, F. H., Alvarez- Rozas. T. P. (2023). Estadística descriptiva con R. Editado por: Fredy Heric Villasante Saravia, Perú. Primera edición digital. isbn: 978 612 00 8827 2. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/20293>.
255. Ratajczak, W., Niedźwiedzka-Rystwej, P., Tokarz-Deptuła, B., Deptuła, W. (2018). Immunological memory cells. *Central European Journal of Immunology*, 43(2), 194-203. <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.77390>.
256. Raynal, J.T., Lopes-Bastos, B., Bagano Vilas-Boas, B. C., de Jesus- Sousa, T., Costa-Silva, M., Aquino- de Sá, M. C., Wagner- Portela, R., Ferreira- Moura-Costa, L., Vasco, A., Meyer, R. (2018). Identification of membrane-associated proteins with pathogenic potential expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum. *BMC Res Notes*, 11, 73. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3180-5>.
257. Rebouças, M. F., Wagner- Portela, R., Lima, D. D., Loureiro, D., Bastos, B. L., Moura-Costa, L.F., Vale, V. L., Miyoshi, A., Vasco, A., Meyer, R. (2011). *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(2), 213–220. <https://doi.org/10.1177/104063871102300204>.
258. Rebouças, M.F., Loureiro, D., Bastos, B.L., Moura-Costa, L.F., Hanna, S.A., Azevedo, V.A., Meyer, R.J., y Portela, R.W. (2013). Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 33, 1296-1302. <https://www.scielo.br/j/pvb/a/msRvksgqcL7wrBdNdY97W4m/?format=pdf>.
259. Rebouças, M.F., Loureiro, D., Barral, T.D., Seyffert, N., Raynal, J.T., Sousa, T.J., Figueiredo, H.C.P., Azevedo, V., Meyer, R., Portela, R.W. (2020). Cell wall glycolipids from *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains with different virulences differ in terms of composition and immune recognition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 2101-2110. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00343-9>.
260. Rehmann, B., y Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 5, 215–229. <https://doi.org/10.1038/nri1573>
261. Reynisson, B., Alvarez, B., Paul, S., Peters, B., Nielsen, M. (2020). NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC 572 antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*, 48, W449–W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa379>.
262. Rezazadeh, Z., Sioofy- Khoojine, A.B., Ashrafi- Helan, J., Hassanzadeh, B., Heydari, A.A. (2012). Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Comparative Clinical Pathology*, 21, 667–671. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1154-7>.
263. Rezende, A.F.S., Brum, A.A., Bezerra, F.S.B., Brait, D.C., Sá, G.L., Thurow, H.S., Seixas, F.K., Azevedo, V.A.C., Portela, R.W., Borsuk, S. (2020). Assessment of the Acid Phosphatase CP01850 from *Corynebacterium Pseudotuberculosis* in DNA and Subunit Vaccine Formulations against Caseous Lymphadenitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72, 199–207. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10790>.
264. Ribeiro, D., Rocha, F.S., Leite, K.M., Soares, S.C., Silva, A., Portela, R.W., Meyer, R. (2014). An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Veterinary Research*, 45, 28. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-28>.
265. Richmond, J.M., y Harris, J.E. (2014). Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(12), a015339-a. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015339>.
266. Robaj, A., Hamidi, A., Bytyqi, H., y Sylejmani, D. (2017). Frequency and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from caseous lymphadenitis in sheep in Kosovo. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23(6), 1033–1036. <https://agrojournal.org/23/06-22.pdf>.

267. Robbins, C.S., Swirski, F.K. (2010). The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16), 2685-2693. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0375-x>.
268. Rodríguez-Domínguez, MC. (2020). Obtención y caracterización de las proteínas recombinantes PLD y CP40, factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ovis con potencial inmunogénico [Tesis Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional Universidad Autónoma del Estado de México. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/110109>.
269. Rodríguez-Domínguez, M.C., Montes-de-Oca-Jiménez, R., Barbabosa-Pliego, A., Díaz-Aparicio, E., Varela-Guerrero, J. A., y Tenorio-Borroto, E. (2022). Isolation, cloning and phylogenetic analysis of pld and cp40, virulence factors of a mexican isolate of *Corynebacterium pseudotuberculosis* ovis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25, 76. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.3768>.
270. Rogers, E.A., Das, A., y Ton-That, H. (2011). Adhesion by pathogenic *Corynebacteria*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, 91–103. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_6.
271. Ronnberg, B., Fekadu, M., Behboudi, S., Kenne, L., Morein, B. (1997). Effects of carbohydrate modification of Quillaja saponaria QH-B fraction on adjuvant activity cholesterol-binding capacity and toxicity. *Vaccine*, 15(17/18), 1820–1826. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00139-4).
272. Roy, A., Swetha, R.G., Basu, S. (2024). Integrating pan-genome and reverse vaccinology to design multi-epitope vaccine against Herpes simplex virus type-1.3 *Biotech*, 14, 176. <https://doi.org/10.1007/s13205-024-04022-6>.
273. Ruiz, J.C., D'Afonseca, V., Silva, A., Ali, A., y Pinto, A.C. (2011). Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*, 6, e18551. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018551>.
274. Ruiz, H., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Baselga, C., Alzuguren, O., Tejedor, M.T., de Miguel, R., Lacasta, D. (2020). The Relevance of Caseous Lymphadenitis as a Cause of Culling in Adult Sheep. *Animals (Basel)*, 10(11), 1962. <https://doi.org/10.3390/ani10111962>.
275. Rushdi, M.N., Pan, V., Li, K. (2022). Cooperative binding of T cell receptor and CD4 to peptide-MHC enhances antigen sensitivity. *Nature Communications*, 13, 7055. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34587-w>.
276. Ryan, G. (2010). CD3 conformation is crucial for signalling. *www.nature.com › nriNature Reviews Immunology*, 10, 7. <https://doi.org/10.1038/nri2703>.
277. Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., Reche, P. A. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Immunologic Research*, 2680160. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>.
278. Santana-Jorge, K.T., Santos, T.M., Tartaglia, N.R., Aguiar, E.L., Souza, R.F., Mariutti, R.B., Eberle, R.J., Arni, R.K., Portela, R.W., Meyer, R., Azevedo, V. (2016). Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. *Microbial Cell Factories*, 15, 83. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0479-6>.
279. Santos, W.R., de Lima, V.M.F., Paraguai- de Souza, E., Bernardo, R.R., Palatnik, M., Palatnik de Sousa, C.B. (2002). Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 21(1–2), 30–43. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00527-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00527-9).
280. Saraiva, M., y O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170-181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>.
281. Sarfraz, A., Qurrat-Ul-Ain Fatima, S., Shehroz, M., Ahmad, I., Zaman, A., Nishan, U., Tayyab, M., Sheheryar, Moura, A. A., Ullah, R., Ali, E. A., y Shah, M. (2024). Decrypting the multi-genome data for chimeric vaccine designing against the antibiotic resistant *Yersinia pestis*. *International immunopharmacology*, 132, 111952. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111952>.
282. Sarma, J. V., y Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and tissue research*, 343(1), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>

283. Sadegh-Nasseri, S., y AeRyon, Kim. (2019). Selection of immunodominant epitopes during antigen processing is hierarchical. *Molecular Immunology*, 113, 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.08.011>.
284. Scaglione, F., Ferrara, F., Dugnani, S., Falchi, M., Santoro, G., y Frascini, F. (1990). Immunomodulatory effects of two extracts of Panax ginseng C.A. Meyer. *Drugs under experimental and clinical research*, 16(10), 537-542. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2100737/>.
285. Schultz, I. J., Chen, C., Paw, B. H., y Hamza, I. (2010). Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 285(35), 26753-26759. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.119503>.
286. Schnurr, M., M. Orban, N. C. Robson, A. Shin, H. Braley, D. Airey, J. Cebon, E. Maraskovsky, y Endres, S. (2009). ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II. *The Journal of Immunology*, 182, 1253-1259. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004114>.
287. Seelig, J., y Seelig, A. (2023). Protein Stability—Analysis of Heat and Cold Denaturation without and with Unfolding Models. *The journal of physical chemistry. B*, 127(15), 3352-3363. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c00882>.
288. Seubert, A., Monaci, E., Pizza, M., O'Hagan, D. T., y Wack, A. (2008). The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(8), 5402-5412. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5402>.
289. Seyffert, N., Silva, R. F., Jardim, J., Silva, W. M., de Paula Castro, T. L., Tartaglia, N. R., Azevedo, V. (2014). Serological proteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. *Veterinary Microbiology*, 174(1-2), 255-260. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.024>.
290. Shadnezhad, A., Naegeli, A., y Collin, M. (2016). CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. *BMC Microbiology*, 16(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0884-3>.
291. Sheldon, J. R., y Heinrichs, D. E. (2015). Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(4), 592-630. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv009>.
292. Shenderov, K., Barber, D.L., Mayer, K.D., Jankovic, D., White, S., Caspar, P., Hieny, S., Trinchieri, G., Besra, G.S., Cerundolo, V., y Sher, A. (2010). Inflammasome-dependent IL-1 β production is critical for complete Freund's adjuvant-induced helper T cell polarization. *The Journal of Immunology*. 184. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.184.suppl.136.44>.
293. SIACON. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. https://nube.siap.gob.mx/index.php/s/oI2ukvy4dVX6DOI?utm_source=NUBE. Consulta 17 / 3/2024
294. SIAP. (2024). Comparativo de avance de la producción pecuaria. Estado de Mexico. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. https://nube.siap.gob.mx/avance_pecuario/#. Consulta 17/03/2024 toneladas.
295. SIAP. (2024). Poblacion ganadera. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera-136762?idiom=es>. Consulta 17 /3 /2024 ovino y caprino.
296. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M., y Scapini, P. (2019). Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends in Immunology*, 40(7), 565-583. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.012>.
297. Silva, J. W., Droppa-Almeida, D., Borsuk, S., Azevedo, V., Portela, R. W., Miyoshi, A., Rocha, F. S., Dorella, F. A., Vivas, W. L., Padilha, F. F., Hernández-Macedo, M. L., y Lima-Verde, I. B. (2014). *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. *BMC Veterinary Research*, 10, 965. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0304-6>.

298. Silva, W. M., Dorella, F. A., Soares, S. C., Souza, G. H., Castro, T. L., Seyffert, N., Figueiredo, H., Miyoshi, A., Le Loir, Y., Silva, A., y Azevedo, V. (2017). A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. *BMC microbiology*, 17(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0925-6>.
299. Silva, M. T. O., Bezerra, F. S. B., de Pinho, R. B., Begnini, K. R., Seixas, F. K., Collares, T., Portela, R. D., Azevedo, V., Dellagostin, O., y Borsuk, S. (2018). Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. *Vaccine*, 36(1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.029>.
300. Simmons, C. P., Hodgson, A. L., & Strugnell, R. A. (1997). Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and immunity*, 65(8), 3048–3056. <https://doi.org/10.1128/iai.65.8.3048-3056.1997>.
301. Smart, J. L., y Rush, P. A. J. (2007). In-vitro heat denaturation of Clostridium botulinum toxins types A, B and C. *International Journal of Food Science & Technology*, 22(3), 293–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb00490.x>.
302. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
303. Soares, S. C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., Carneiro, A., Ali, A., Santos, A. R., Pinto, A. C., Diniz, C., Barbosa, E. G., Dorella, F. A., Aburjaile, F., Rocha, F. S., Nascimento, K. K., Guimarães, L. C., Almeida, S., Hassan, S. S., Bakhtiar, S. M., Pereira, U. P., Azevedo, V. (2013). The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. *PloS one*, 8(1), e53818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053818>.
304. Soares, G.M., Rodrigues, P.M., dos Santos, L.R., Galvão, C.E., Oliveira, L.C., Andrade, G.B., y Oliveira, C. (2018). Evaluation of virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates in BALB/c mice. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte*, 42, 1983-9715. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1106896/1/AvaliacaodavirulenciaideisoladosdeCorynebacterium.pdf>.
305. Sobrinho Santos, E. M., Almeida, A. C., Santos, H. O., Cangussu, A. S. R., Almeida, D. A., & Costa, K. S. (2018). Leader gene of *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be useful in vaccines against caseous lymphadenitis of goats: a bioinformatics approach. *The Journal of veterinary Medical Science*, 80(8), 1317–1324. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0581>.
306. Sprake, P., y Gold, J. R. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis* liver abscess in a mature alpaca (Lama pacos). *The Canadian Veterinary Journal = La revue veterinaire canadienne*, 53(4), 387–390. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23024384/>.
307. Spring, M. D., Cummings, J. F., Ockenhouse, C. F., Dutta, S., Reidler, R., Angov, E., Bergmann-Leitner, E., Stewart, V. A., Bittner, S., Juompan, L., Kortepeter, M. G., Nielsen, R., Krzych, U., Tierney, E., Ware, L. A., Dowler, M., Hermsen, C. C., Sauerwein, R. W., de Vlas, S. J., Ofori-Anyinam, O., Heppner, D. G., Jr (2009). Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. *PloS One*, 4(4), e5254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005254>.
308. Stanford, K., Brogden, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C., y Audibert, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Canadian journal of veterinary research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 62(1), 38–43. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9442938/>.
309. Stahl-Hennig, C., Eisenblatter, M., Jasny, E., Rzehak, T., Tenner-Racz, K., Trumpfheller, C., Salazar, A.M., Uberla, K., Nieto, K., Kleinschmidt, J. (2009). Synthetic double-stranded RNAs are

- adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. *PLoS Pathogenesis*, 5, e1000373. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000373>.
310. Stefańska, I., Gieryńska, M., Rzewuska, M., y Binek, M. (2010). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish journal of Veterinary Sciences*, 13(1), 143–149. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21077443/>.
311. Stertman, L., Palm, A. E., Zarnegar, B., Carow, B., Lunderius Andersson, C., Magnusson, S. E., Carnrot, C., Shinde, V., Smith, G., Glenn, G., Fries, L., y Lövgren Bengtsson, K. (2023). The Matrix-M™ adjuvant: A critical component of vaccines for the 21st century. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 19(1), 2189885. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2189885>.
312. Sting, R., Schneider-Bühl, L., Wagner, H., Maget, J., Polley, B., Bürstel, D. (2017). Clinical and serological investigations on caseous lymphadenitis in goat breeding herds in Baden-Wuerttemberg. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 130, 136–143. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-16024>.
313. Stokes, W. S., Schechtman, L. M., y Hill, R. N. (2002). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM): a review of the ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, 30 Suppl 2, 23–32. <https://doi.org/10.1177/026119290203002S04>.
314. Striedner, G., Cserjan-Puschmann, M., Pötschacher, F., y Bayer, K. (2003). Tuning the transcription rate of recombinant protein in strong *Escherichia coli* expression systems through repressor titration. *Biotechnology progress*, 19(5), 1427–1432. <https://doi.org/10.1021/bp034050u>.
315. Studier F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.
316. Siva Subramaniam, N., Morgan, E. F., Wetherall, J. D., Stear, M. J., y Groth, D. M. (2015). A comprehensive mapping of the structure and gene organisation in the sheep MHC class I region. *BMC genomics*, 16, 810. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1992-4>.
317. Sun, H. X., Qin, F., y Ye, Y. P. (2005). Relationship between haemolytic and adjuvant activity and structure of protopanaxadiol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng*. *Vaccine*, 23(48-49), 5533–5542. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.036>.
318. Sun, H., Yang, Z., y Ye, Y. (2006). Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng*. *International Immunopharmacology*, 6(1), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.07.003>.
319. Sun, H., Yang, Z., y Ye, Y. (2006). Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng*. *International immunopharmacology*, 6(1), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.07.003>.
320. Sutherland, S. S., Speijers, E. J., y Andres, B. (1989). Comparison of the exotoxins of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Research in Veterinary Science*, 47(2), 190–194.
321. Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J. L., Kohler, R. H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T. R., Libby, P., Weissleder, R., y Pittet, M. J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325(5940), 612–616. <https://doi.org/10.1126/science.1175202>.
322. Syame, S. M., Abuelnaga, A. S. M., Ibrahim, E. S., & Hakim, A. S. (2018). Evaluation of specific and non-specific immune response of four vaccines for caseous lymphadenitis in sheep challenged. *Veterinary World*, 11(9), 1272–1276. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1272-1276>.
323. Tachedjian, M., Krywult, J., Moore, R. J., & Hodgson, A. L. (1995). Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine*, 13(18), 1785–1792. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(95\)00144-p](https://doi.org/10.1016/0264-410x(95)00144-p).
324. Takechi, M., Shimada, S., y Tanaka, Y. (1992). Time course and inhibition of saponin-induced hemolysis. *Planta Medica*, 58(2), 128–130. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961413>.
325. Takechi, M., y Tanaka, Y. (1995). Haemolytic time course differences between steroid and triterpenoid saponins. *Planta medica*, 61(1), 76–77. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958006>.

326. Tavares, I. F., Sá, M. D. C. A., Raynal Rocha Filho, J. T., Trindade, S. C., Fraga, R. E., y Meyer, R. (2024). Immune response of BALB/c mice infected with two strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbial Pathogenesis*, 192, 106671. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106671>.
327. Terab, A. M. A., Abdel Wahab, G. E. D., Ishag, H. Z. A., Khalil, N. A. H., El Tigani-Asil, E. T. A., Hashem, F. M., Khalafalla, A. I., Shah, A. A. M., y Al Muhairi, S. S. M. (2021). Pathology, bacteriology and molecular studies on caseous lymphadenitis in *Camelus dromedarius* in the Emirate of Abu Dhabi, UAE, 2015-2020. *PloS One*, 16(6), e0252893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252893>.
328. Tesema, Z., Alemayehu, K., Kebede, D., Getachew, T., Deribe, B., Tilahun, M., Kefale, A., Lakew, M., Zegeye, A., Belayneh, N., Yizengaw, L., Shibeshi, M., Tiruneh, S., Worku, G., Kiros, S., & Bishaw, M. (2021). Evaluation of growth and efficiency-related traits of different levels of Boer x Central Highland crossbred goats. *Heliyon*, 7(10), e08184. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08184>.
329. Thaís de Oliveira Silva, M., Barros de Pinho, R., da Rocha Fonseca, B., Silvestre Brilhante Bezerra, F., Severo Sabedra Sousa, F., Kommling Seixas, F., Collares, T.V., José Meyer Nascimento, R., Wagner Portela, R., Ariston Carvalho Azevedo, V., y Borsuk, S. (2020). NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Vaccine*, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.010>.
330. Tighe, H., Takabayashi, K., Schwartz, D., Van Nest, G., Tuck, S., Eiden, J. J., Kagey-Sobotka, A., Creticos, P. S., Lichtenstein, L. M., Spiegelberg, H. L., y Raz, E. (2000). Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 106(1 Pt 1), 124–134. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.107927>.
331. Torky, H. A., Saad, H. M., Khaliel, S. A., Kassih, A. T., Sabatier, J. M., Batiha, G. E., Hetta, H. F., Elghazaly, E. M., y De Waard, M. (2023). Isolation and Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Association with Proinflammatory Cytokines in Caseous Lymphadenitis Pyogranulomas. *Animals*, 13(2), 296. <https://doi.org/10.3390/ani13020296>.
332. Trinchieri, G., Pflanz, S., y Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19(5), 641–644. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00296-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00296-6).
333. Trost, E., Ott, L., Schneider, J., Schröder, J., Jaenicke, S., Goesmann, A., Husemann, P., Stoye, J., Dorella, F. A., Rocha, F. S., Soares, S.deC., D'Afonseca, V., Miyoshi, A., Ruiz, J., Silva, A., Azevedo, V., Burkovski, A., Guiso, N., Join-Lambert, O. F., Kayal, S., Tauch, A. (2010). The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, 11, 728. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-728>.
334. Valdivia-Silva, J. E., Maya-Pastén, M., y Peña-Fernández, J. (2014). Las células guardianes residentes de la piel y su papel en la respuesta inmune. Parte 1. *Dermatol PU*, 24 (1).
335. Vale, V. L., Silva, M.daC., de Souza, A. P., Trindade, S. C., de Moura-Costa, L. F., Dos Santos-Lima, E. K., Nascimento, I. L., Cardoso, H. S., Marques, E.deJ., Paule, B. J., y Nascimento, R. J. (2016). Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a *C. pseudotuberculosis* strain. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0811-8>.
336. Varela-Guerrero, J. A., de Oca Jiménez, R. M., Acosta Dibarrat, J., León, F. H., Morales-Erasto, V., y Salazar, H. G. M. (2018). Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. *Microbial pathogenesis*, 117, 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.031>.
337. van Doorn, E., Liu, H., Huckriede, A., y Hak, E. (2016). Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA™51 as vaccine adjuvant: A systematic review. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(1), 159–169. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1071455>.
338. Viana, M. V. C., Figueiredo, H., Ramos, R., Guimarães, L. C., Pereira, F. L., Dorella, F. A., Selim, S. A. K., Salaheldeen, M., Silva, A., Wattam, A. R., y Azevedo, V. (2017). Comparative genomic

- analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. *PloS one*, 12(4), e0176347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176347>
339. Viana, M. V. C., Sahm, A., Góes Neto, A., Figueiredo, H. C. P., Wattam, A. R., y Azevedo, V. (2018). Rapidly evolving changes and gene loss associated with host switching in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *PloS one*, 13(11), e0207304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207304>.
340. Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L., y Steenbergen, S. M. (2004). Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 68(1), 132–153. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.1.132-153.2004>.
341. Vives-Pi, M., Somoza, N., Fernández-Alvarez, J., Vargas, F., Caro, P., Alba, A., Gomis, R., Labeta, M. O., y Pujol-Borrell, R. (2003). Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 133(2), 208–218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02211.x>.
342. Voehringer, D. (2013). Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nature reviews. Immunology*, 13(5), 362–375. <https://doi.org/10.1038/nri3427>.
343. Von-Graevenitz, A. y Bernard, K. (2006). The Genus *Corynebacterium*-Medical. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (Ed.) *The Prokaryotes*. New York, USA: Springer.
344. Walker, J., Jackson, H. J., Eggleton, D. G., Meeusen, E. N., Wilson, M. J., & Brandon, M. R. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infection and Immunity*, 62(6), 2562–2567. <https://doi.org/10.1128/iai.62.6.2562-2567.1994>.
345. Walker, J., Wilson, M. J., y Brandon, M. R. (1995). Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, 63(1), 206–211. <https://doi.org/10.1128/iai.63.1.206-211.1995>.
346. Wang, L., Fuster, M., Sriramaraio, P., y Esko, J. D. (2005). Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nature Immunology*, 6(9), 902–910. <https://doi.org/10.1038/ni1233>.
347. Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhu, S., Li, Y., Li, M., y Yu, B. (2007). Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(7), 2528–2532. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.058>.
348. Wang, J., Hossain, M., Thanabalasuriar, A., Gunzer, M., Meininger, C., y Kubes, P. (2017). Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6359), 111–116. <https://doi.org/10.1126/science.aam9690>.
349. Wang, P. (2021). Natural and Synthetic Saponins as Vaccine Adjuvants. *Vaccines*, 9, 222. <https://doi.org/10.3390/vaccines 9030222>.
350. Wernery, U., y Kinne, J. (2016). Caseous Lymphadenitis (Pseudotuberculosis) in Camelids: A Review. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 20, 3(1), 1022.
351. Wertheim, K. Y., Puniya, B. L., La Fleur, A., Shah, A. R., Barberis, M., y Helikar, T. (2021). A multi-approach and multi-scale platform to model CD4+ T cells responding to infections. *PLoS Computational Biology*, 17(8), e1009209. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009209>.
352. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., y Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of Virology*, 77(8), 4911–4927. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003>.
353. Williamson, L. H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*, 17(2), 359–vii. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30033-5](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30033-5).
354. Windsor P. A. (2011). Control of caseous lymphadenitis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 27(1), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.019>.
355. Windsor, P. A. (2014). Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*, 5, 11–22. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S44814>.

356. Windsor, P.A., y Bush, R.D. (2016). Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination?. *Small Ruminant Research*, 142, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.03.023>.
357. Woo, S. H., Lumpkin, E. A., y Patapoutian, A. (2015). Merkel cells and neurons keep in touch. *Trends in Cell Biology*, 25(2), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.003>.
358. Wu, F., Bhansali, S. G., Law, W. C., Bergey, E. J., Prasad, P. N., y Morris, M. E. (2012). Fluorescence imaging of the lymph node uptake of proteins in mice after subcutaneous injection: molecular weight dependence. *Pharmaceutical Research*, 29(7), 1843–1853. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0708-6>.
359. Wu, S., Hua, Z. J., Xiao, Y. L., Wang, Y., Zhang, J., Zhang, H. Y., y Du, W. Y. (1991). Effect of ginsenoside on the 3H-TdR integration of human blood lymphocyte. *Chinese Medical Journal*, 104(5), 399–401. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1879210/>.
360. Xie, Y., Pan, H., Sun, H., y Li, D. (2008). A promising balanced Th1 and Th2 directing immunological adjuvant, saponins from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Vaccine*, 26(31), 3937–3945. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.061>.
361. Xie, Y., Ye, Y. P., Sun, H. X., y Li, D. (2008). Contribution of the glycidic moieties to the haemolytic and adjuvant activity of platycodigenin-type saponins from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Vaccine*, 26(27-28), 3452–3460. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.023>.
362. Xiong-Liew, P. X., y Kubes, P. (2019). The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological reviews*, 99(2), 1223–1248. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>.
363. Xu, Q. F., Fang, X. L., & Chen, D. F. (2003). Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3), 187–192. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00317-3](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00317-3).
364. Yang, G.Z., Bao, T., Fu, N., Gen, P.L. (1983). A preliminary study on the immunomodulatory effects of ginseng saponins in vitro and in vivo. Norman Bethune Health Science Center of Jilin University, 9:1–7.
365. Yen, J. H., Khayrullina, T., y Ganea, D. (2008). PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration. *Blood*, 111(1), 260–270. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-090613>.
366. Yeruham, I., Friedman, S., Perl, S., Elad, D., Berkovich, Y., y Kalgard, Y. (2004). A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. *Veterinary dermatology*, 15(5), 315–320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2004.00388.x>.
367. Yoshikawa, M., Morikawa, T., Yashiro, K., Murakami, T., y Matsuda, H. (2001). Bioactive saponins and glycosides. XIX. Notoginseng (3): immunological adjuvant activity of notoginsenosides and related saponins: structures of notoginsenosides-L, -M, and -N from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 49(11), 1452–1456. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.1452>.
368. Wang, Y. M., y Alexander, S. I. (2009). CD8 regulatory T cells: what's old is now new. *Immunology and Cell Biology*, 87(3), 192–193. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.8>.
369. Zaid, K., Yusuf Osman, A., Jesse, F. F., Wahid-Haron, A. (2013). Sex hormone profiles and cellular changes of reproductive organs of mice experimentally infected with *C. pseudotuberculosis* and its exotoxin phospholipase D (PLD). *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 1 (3), 24-29. www.iosrjournals.org.
370. Zanna, M. Y., Yasmin, A. R., Omar, A. R., Arshad, S. S., Mariatulqabtiah, A. R., Nur-Fazila, S. H., y Mahiza, M. I. N. (2021). Review of Dendritic Cells, Their Role in Clinical Immunology, and Distribution in Various Animal Species. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8044. <https://doi.org/10.3390/ijms22158044>.
371. Zanoni, I., Tan, Y., Di Gioia, M., Springstead, J. R., y Kagan, J. C. (2017). By Capturing Inflammatory Lipids Released from Dying Cells, the Receptor CD14 Induces Inflammasome-Dependent Phagocyte Hyperactivation. *Immunity*, 47(4), 697–709.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.010>.
372. Zhao, X., Deak, E., Soderberg, K., Linehan, M., Spezzano, D., Zhu, J., Knipe, D. M., y Iwasaki, A. (2003). Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(2), 153–162. <https://doi.org/10.1084/jem.20021109>.

373. Zhao, T., Cai, Y., Jiang, Y., He, X., Wei, Y., Yu, Y., y Tian, X. (2023). Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 283. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01557-7>
374. Zheng, S., Wang, Y., Liu, H., Chang, W., Xu, Y., y Lin, F. (2019). Prediction of Hemolytic Toxicity for Saponins by Machine-Learning Methods. *Chemical Research in Toxicology*, 32(6), 1014–1026. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00347>.
375. Zhou, Z., Li, H., Zhang, M., Wang, Z., Zhou, R., Hu, S., Li, X., Song, X., y Zhu, Z. (2016). Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strain XH02 Isolated from a Boer Goat in Xuanhan, China. *Genome announcements*, 4(6), e01329-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01329-16>.
376. Zhu, D., y Tuo, W. (2016). QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Natural products Chemistry & Research*, 3(4), e113. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000e113>.
377. Ziegler-Heitbrock, H. W., y Ulevitch, R. J. (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology today*, 14(3), 121–125. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90212-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90212-4).
378. Zoetis. (2020). Zoetis Spain, S.L. Avda. de Europa 20 B, Parque Empresarial La Moral. https://www.zoetis.es/_locale-assets/spc/biodectin.pdf. Acceso enero, 2025.
379. Zuccarino-Catania, G. V., Sadanand, S., Weisel, F. J., Tomayko, M. M., Meng, H., Kleinstein, S. H., Good-Jacobson, K. L., y Shlomchik, M. J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nature Immunology*, 15(7), 631–637. <https://doi.org/10.1038/ni.2914>.