

**Evaluación de la respuesta inmune de
la vacuna de subunidades PLD y CP40
frente a *Corynebacterium
pseudotuberculosis* biovar *ovis***

Roberto Montes-de-Oca-Jiménez.
María Carla Rodríguez Domínguez.
Martha Elba Ruiz-Riva-Palacio.
Pilar Eliana Rivadeneira-Barreiro.
Pablo Cleomenes Zambrano-Rodríguez.
Fátima Ingrid López Vivas.





Resumen

La ganadería ovina y caprina se ve gravemente afectada por la linfadenitis caseosa (LAC), enfermedad infecto-contagiosa ocasionada por la bacteria Gram positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se caracterizan por la formación de abscesos en nódulos linfáticos superficiales y/o viscerales. La enfermedad afecta la obtención de lana, carne, leche y causa daños en la reproducción provocando pérdidas económicas significativas en la industria de los pequeños rumiantes. En México los datos de prevalencia sobre LAC son limitados; sin embargo, se ha reportado una frecuencia de 33.3% de la enfermedad en los rebaños del Estado de Jalisco. A nivel mundial la profilaxis se lleva a cabo mediante la aplicación de vacunas comerciales formuladas con cultivos bacterianos totales inactivados, sin embargo, éstos no han sido eficaces para el control de la enfermedad. Las vacunas desarrolladas utilizando la tecnología del ADN recombinante son inocuas e inmunogénicas, permitiendo la activación del sistema inmune. Las proteínas PLD y CP40 son factores de patogenicidad de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*, y sus potencialidades inmunogénicas han sido evaluadas de forma individual, confiriendo protección en animales infectados experimentalmente con *C. pseudotuberculosis*. 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 esta enfermedad. Es por ello que el desarrollo de una vacuna, de producción nacional, utilizando aislados autóctonos constituye una alternativa para abordar esta problemática. En el presente capítulo se exponen los resultados de la respuesta inmune inducida mediante la aplicación de una vacuna experimental de subunidades PLD y CP40, evaluada en un modelo murino para la profilaxis contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

Palabras Clave: *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*, vacuna, PLD y CP40.



Introducción

Las vacunas constituyen una herramienta para el control y erradicación de las enfermedades, también evitando el uso de los antimicrobianos. A través de la inmunización se induce en el hospedero el desarrollo de los mecanismos de acción del sistema inmune, destinados a la eliminación del patógeno. Existen vacunas comerciales y experimentales para la profilaxis de la linfadenitis caseosa, cuya aplicación a nivel mundial reporta niveles de protección variable en los rebaños. 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. Las proteínas PLD y CP40 constituyen factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* que han sido utilizadas como antígenos vacunales confiriendo protección en animales infectados experimentalmente. La toxina PLD causa daño tisular y favorece la diseminación del microorganismo en el hospedero. Por su parte, la proteína endoglicosidasa CP40 tiene la capacidad de romper los enlaces glucosídicos de la región Fc de los Ac IgG de los ovinos, causando la degradación de los mismos. La protección de las vacunas comerciales se asocia con la inducción de la respuesta humoral dirigida fundamentalmente contra la proteína exotoxina PLD. En su mayoría estas vacunas se formulan con cultivos totales de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* inactivados con formalina, con abundante proteína PLD. La neutralización de la PLD mediada por la respuesta humoral disminuye el daño tisular, sin embargo, la protección debe ser integral incorporando en las formulaciones vacunales moléculas que favorezcan la activación de la respuesta inmune mediada por células para eliminar la bacteria intracelular. Los resultados experimentales en modelos murinos y ovinos indican que el uso de CP40 en formulaciones vacunales favorece la activación de la respuesta inmune celular, a través de una respuesta que involucra la participación de los receptores tipo Toll 2.

La tecnología del ADN recombinante permite obtener antígenos con potencialidades inmunogénicas que pueden ser utilizados en nuevas vacunas. En este sentido las vacunas de subunidades recombinantes, que combinan más de un tipo de antígeno inmunogénico constituyen una ventaja para la activación de la respuesta inmune. En el presente capítulo se exponen los resultados de la respuesta inmune inducida mediante la aplicación de una vacuna experimental de subunidades PLD y CP40, evaluada en un modelo murino para la profilaxis contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

Evaluación de la respuesta inmune humoral (IgG Totales murinos) contra PLD y CP40 mediante la técnica de ELISA

La respuesta inmune adaptativa generada por una vacuna depende en gran medida de la capacidad que tengan estas formulaciones para inducir activación de las células linfocitos



B y T. Los Linfocitos B son la población del sistema inmune encargada de la generación de los anticuerpos (Ac). La detección de la respuesta de Ac se utiliza como un indicador de la eficacia de las vacunas. Las IgM son la subclase de Ac que primero se sintetizan tras el contacto directo con el antígeno.

La detección de estas moléculas en el suero representa la respuesta ante una infección inicial o aguda, también son secretadas durante la respuesta inmune secundaria pero en una menor concentración. La subclase de Ac de tipo IgG se produce ante una respuesta secundaria contra los antígenos, son las moléculas con mayor concentración en el suero, y se relacionan con la respuesta de defensa sistémica y de memoria. Estos Ac son los encargados de llevar a cabo la neutralización de los patógenos, activación del complemento con opsonización y fagocitosis de patógenos, promueven la muerte de las células infectadas mediante la activación de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Por tales motivos, la detección de los anticuerpos IgG es fundamental en la caracterización de la respuesta inmune producida por las vacunas.

En el trabajo realizado por Rodríguez-Domínguez, 2020, y Rodríguez-Domínguez, 2022, se obtuvieron los componentes activos de la vacuna experimental de subunidades PLD y CP40, vía recombinante utilizando cepas de *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET28a-pld y pET28a-cp40. Los genes codificantes de las proteínas de interés se amplificaron mediante PCR a partir del genoma del aislado mexicano *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* 2J-L.

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). La vacuna experimental se aplicó en un modelo murino (ratones BALB/c), utilizando 6 grupos de animales: 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 10^4 UFC/mL *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* cepa ATCC 43926. Se administraron 200µL de los formulados vacunales o PBS, 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 10^4 UFC/mL de la cepa virulenta ATCC 43926.

Los animales del grupo PLDr+CP40r presentaron títulos de IgG anti-PLD elevados, seguidos por el grupo PLDr, ambos con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Los niveles de anticuerpos IgG anti-PLDr de estos grupos alcanzaron valores por encima de una DO=1.2 luego de 30 días 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 IgG anti-PLD 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. Por otra parte, Vale y colaboradores en el 2016 reportan valores de IgG 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. 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. 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. Recientemente, Moreira y colaboradores en el 2022 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 ($p < 0.01$). En el modelo experimental cobayos, Park y colaboradores en el 2024 evaluaron la inmunización con diferentes dosis de *C. pseudotuberculosis* (G1: 10^7 , G2: 10^6 , G3: 10^5 . Transcurridas 6 semanas se evidenció un aumento en los niveles de anticuerpos anti-PLD con DO entre 1 y 1.5, con diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

En el presente trabajo los niveles de Ac anti-CP40 fueron superiores en el grupo PLDr+CP40r en comparación con el grupo CP40r tras 21 días de la primera inmunización. 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 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 (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. Silva y colaboradores en el 2014 reportaron que en 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. En otro trabajo del



grupo de Droppa-Almeida y colaboradores en el 2016 se demostró que la inmunización de ratones BALB/c (2 dosis de CP40r + saponina) durante la primera etapa de la vacunación (30 días) los valores se mantuvieron por debajo de 0.3. 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.

En el presente trabajo el análisis de los anticuerpos IgG totales utilizando el sistema de ELISA 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. Estos resultados se deben a que 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. En la formulación donde se combinaron ambas proteínas el aporte de anticuerpos anti-PLD fue superior con diferencias estadísticas significativas tanto en las etapas de vacunación como luego del desafío. Existe jerarquía entre los epítomos de las proteínas y la presencia de epítomos inmunodominantes en la proteína PLD es 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 células presentadoras de antígenos (APC) que contienen moléculas accesorias como la DM y DO, y un conjunto de enzimas proteolíticas y desnaturizantes principalmente catepsinas y tiorredoxina lisosomal inducible por interferón gamma, que generan y recortan los determinantes antigénicos. 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 (DRα 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 dirige 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. Hillier y colaboradores en el 2005 muestran evidencias sobre este planteamiento; ya que, en el estudio de un candidato a vacuna recombinante contra la malaria, LSA-NRC, 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. El péptido que contenía 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.

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 antígenos. Los péptidos unidos a DR1 (8 secuencias de péptidos derivados de PAD4) se 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 epítomo 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. 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 epítopos de diferentes proteínas compiten por la misma molécula 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 por Sadegh-Nasseri y Kim, 2019 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). 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 epítopos 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 epítopos inmunodominantes tampoco se debió a una falta de susceptibilidad a la digestión con cathepsina, ya que ambos epítopos sintéticos se digirieron cuando se incubaron solo con la mezcla de cathepsina. Sin embargo, como proteínas de longitud completa, la ubicación de los dos epítopos; 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 epítopos dominantes. La jerarquía de epítopos 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 epítopos inmunodominantes puedan volverse subdominantes o crípticos cuando otros epítopos más robustos (PLD) están presentes simultáneamente. La ubicación de un epítipo 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.



Evaluación de la respuesta inmune celular de la vacuna de subunidades PLD y CP40 mediante la técnica de citometría de flujo

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 presente 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 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). 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. 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. Los estudios realizados por He y colaboradores en el 2017, sugieren que la funcionalidad de las células B de memoria podría estar determinada por los marcadores del subconjunto CD80, PD-L2 y CD73). 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 según



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. Autores como Brynjolfsson *et al.*, 2018; Khodadadi *et al.*, 2019 plantean que estas células residen principalmente en la médula ósea y son diferenciadas con una vida útil que varía de meses a décadas. Estos marcadores podrían ser evaluados en próximos estudios para establecer el comportamiento de células de memoria ante la aplicación de la vacuna.

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 y colaboradores en el 2016 identificó un perfil de IgG de tipo IgG2a, IgG2b e IgG3 (sín la identificación de IgG1) lo que sugiere que la respuesta inducida tras la vacunación con la proteína CP40r es de tipo Th1. Por otra parte Silva y colaboradores en el 2014, evidenciaron en el grupo de animales inmunizados con CP40r un aumento significativo de IgG1, cambiando el perfil a IgG2 luego del desafío. Este mismo grupo de investigadores en el 2019, 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. 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 . En el 2024 Pinho y colaboradores 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 ($p < 0,05$). 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 para inducir una respuesta de tipo humoral y celular, señalando el aporte que cada antígeno brinda a la formulación final.



Los niveles de protección inducidos por las vacunas comerciales varían según el país donde han sido aplicadas, el tipo de hospedero ovino o caprino, las cepas bacterianas circulantes, entre otros factores, siendo un denominador común el efecto protector parcial. Estas vacunas disminuyen las manifestaciones clínicas de la enfermedad y reducen los granulomas en los animales vacunados pero el porcentaje de protección varía, reportándose valores que van desde 60 a 80 %. Las vacunas comerciales Glanvac 3 (Zoetis, London) y Glanvac 6 (Zoetis, West Ryde, Australia), presentan formulaciones compuestas por PLD de *C. pseudotuberculosis* y toxinas de *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei*. Los reportes de su aplicación en diversos países, principalmente Australia, indican que disminuye los signos y síntomas clínicos de la enfermedad, así como la producción de lesiones y abscesos.. En Australia se ha logrado una disminución en la incidencia de la enfermedad en ovinos y caprinos, con reportes de protección que van desde 25% hasta un 90% del total del rebaño. La evaluación en el 2009 mostró valores aún menores donde el rango de prevalencia fue de 26% a 5.9%. Las vacunas de gama Glanvac representan una opción para la inmunización de los rebaños; sin embargo, se asocia a ellas algunas reacciones adversas leves como alopecia y fistulas en el sitio de inoculación y otras de mayor complejidad que incluyen la formación de abscesos en el sitio de inoculación y choques anafilácticos, siendo estas reacciones más severas en los caprinos.

La vacuna Caseous D-T (Colorado Serum, EUA) es una variante que incluye toxinas de *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, y de *C. pseudotuberculosis*. Este inmunógeno se utiliza en Estados Unidos, los resultados de su aplicación indican protección asociada con un menor desarrollo de abscesos. También se reportan efectos adversos como: leve cojera y manifestaciones de molestias en ovinos jóvenes y letargo en general en gran parte de la población vacunada. 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. El estudio de esta vacuna en ovinos indicó una disminución en las lesiones característica de la LAC, donde de 20 animales solo 8 mostraron abscesos.

La vacuna Biodectin™ (Zoetis, España), incluye antígenos de *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Tipo B, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* Tipo D, *C. pseudotuberculosis* y *Clostridium chauvoei* y es utilizada en España. El inmunógeno

LinfoVac (Laboratorios Vencofarma do Brasil) es fabricado 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. Está compuesta por 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.



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, los grupos de investigación líderes en la temática continúan trabajando en el desarrollo de vacunas que activen la respuesta inmune de tipo celular, para lograr una mayor protección, y disminución en los efectos adversos.

Conclusión

La vacuna de subunidades PLD y CP40 mostró un aumento en la respuesta inmune humoral y celular con diferencias estadísticas significativas tanto en las etapas de vacunación como luego del desafío. 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. Existe jerarquía entre los epitopos de las proteínas y la presencia de epitopos inmunodominantes en la proteína PLD puede ser uno de los factores que influyen en el predominio de Ac contra esta molécula. La respuesta inmune celular evaluada mediante la fenotipificación de las poblaciones de LinF B (CD19+) y LinF T (CD4+, CD8+) por citometría de flujo fue superior en los animales del inmunizados con ambas proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

Bibliografía

- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- Fontaine, M. (2015). Caseous lymphadenitis in sheep. *The Moredun Foundation News Sheet* 6(5). <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:31272268>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.



- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.