



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD
ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE CON UN
ADYUVANTE DE ALUMINIO-SILICATO COMO INMUNÓGENO
PARA LA BRUCELOSIS CAPRINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ERIK GIOVANNI HERNÁNDEZ BADILLO

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Francisco Suárez Güemes FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORIAL:

Dr. Efrén Díaz Aparicio INIFAP

Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo FM-UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX AGOSTO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por los proyectos:

TAMU- CONACYT 2015-044(S), Microcapsule delivery Platform to enhance Immune protection against Brucellosis.

PAPIIT No. 201517: Evaluación de inmunógenos proteicos encapsulados para la prevención de la brucelosis caprina

y PAPIIT No. IN225019 Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral en caprinos, estimulada por vacunas contra la brucelosis.

Agradezco a mi familia, esposa (Gabriela) e hijos por todo el apoyo y paciencia que me brindaron, a mis papás y mis suegros que siempre me brindaron su ayuda., a mis tutores, quienes me ayudaron y corrigieron durante este camino, además que me brindaron de su conocimiento y opiniones para poder realizar este proyecto. A todos mis amigos de laboratorio (Miguel, Skarlet, Alejandro) quienes me ayudaron en la toma de muestras, en realizar los experimentos, y me dieron sugerencias en los experimentos para poder obtener los resultados que buscábamos. A Isabel del INIFAP que me ayudo en los cultivos de *B. melitensis*, así como en la preparación de todo el material para trabajar en el laboratorio. A Christian y su papá quienes nos ayudaron todo el tiempo en el mantenimiento del bienestar de los animales en instalaciones del INIFAP, además que nos ayudaron en el proceso de tomar las muestras. Al personal del rancho San Francisco en Chalco quienes nos ayudaron con el cuidado de los animales que se encontraban en ese lugar

INDÍCE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Antecedentes de la brucelosis en México	3
1.2. Brucelosis caprina	6
1.2.1. Etiología	7
1.2.2. Epidemiología	9
1.2.3. Patogenia	12
1.2.4. Signos clínicos	17
1.2.5. Inmunopatología.....	17
1.2.6. Diagnóstico	19
1.2.7. Profilaxis y tratamiento	20
1.3. Proteínas BtuB, Hia y FlgK	22
1.4. Adyuvantes.....	23
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. General.....	27
3.2. Específicos	27
4. HIPÓTESIS.....	27
5. MATERIAL Y METODOS	28
5.1. Animales y diseño del experimento	28
5.2. Toma de muestras.....	30
Muestras de sangre	30
Muestras de órganos.....	30
5.3. Prueba de tarjeta al 3%	31
5.4. Análisis bacteriológico.....	31
5.5. Extracción de células mononucleares de sangre periférica	31
5.6. Cuantificación de INF- γ (Prueba de Bovigam®).....	32
5.7. Extracción de RNA total a partir de PBMC	33
5.8. Síntesis de cDNA (RT)	33
5.9. Cuantificación de la expresión de citocinas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
6. RESULTADOS	35
Resultados a la prueba de tarjeta al 3% postvacunación.....	35
Resultados de la inseminación	36

Resultados a la prueba de tarjeta al 3% postdesafío	37
Manifestación clínica y aislamiento de <i>B. melitensis</i> a partir de órganos y tejidos.....	38
Resultados <i>in vitro</i>	41
Producción de INF- γ a partir de cultivo celular <i>in vitro</i>	41
6.2.1. Perfil de citocinas.....	43
7. DISCUSIÓN.....	45
8. CONCLUSIONES	51
9. -BIBLIOGRAFÍA.....	52

“Evaluación de una proteína recombinante con un adyuvante de aluminio-silicato como inmunógeno para la brucelosis caprina”

Resumen

La brucelosis es una zoonosis bacteriana endémica en México y afecta a múltiples especies ganaderas con importancia económica para el desarrollo del país. Las cabras son el principal hospedero de *Brucella melitensis*, y provoca problemas de tipo reproductivo principalmente, como aborto y nacimiento de crías débiles. Actualmente la vacuna que se usa para la prevención de la enfermedad en las cabras tiene una serie de desventajas que limitan su uso seguro, por lo cual han surgido nuevas opciones de vacunas recombinantes que son más seguras, pero suelen ser menos inmunogénicas. El objetivo de este proyecto fue probar un inmunógeno en el modelo caprino, a base de tres proteínas recombinantes (Hia, FlgK y BTuB) de *B. melitensis* más un adyuvante de aluminio-silicato que anteriormente había sido probado en ratones. Las cabras se vacunaron, 95 días después se inseminaron y a los 90 días de gestación fueron desafiadas con la cepa virulenta 16M de *B. melitensis*. El desafío del grupo que se vacunó con el inmunógeno recombinante resultó en una tasa de aborto del 62.5%, mientras que el grupo Rev -1 tuvo una tasa de aborto del 27.2%. Por otro lado, logramos el aislamiento de la cepa virulenta del 70% de las cabras del grupo del inmunógeno. Los resultados demuestran que el inmunógeno no supera la protección que confiere la vacuna actual Rev-1.

Abstract

Brucellosis is an endemic bacterial zoonosis in Mexico and affects multiple livestock species with economic importance for the country's development. Goats are the main host of *Brucella melitensis*, and causes mainly reproductive problems, such as abortion and the birth of weak offspring. Currently the vaccine that is used for the prevention of disease in goats has several disadvantages that limit its safe use, thus new recombinant vaccine options have emerged that are safer but are usually less immunogenic. The objective of this project was to test an immunogen in the goat model, based on three recombinant proteins (Hia, FlgK and BTuB) of *B. melitensis* plus an aluminum-silicate adjuvant that had previously been tested in mice. Goats were vaccinated, 95 days later they were inseminated and at 90 days of gestation they were challenged with the 16M virulent strain of *B. melitensis*. The challenge of the group that was vaccinated with the recombinant immunogen resulted in an abortion rate of 62.5%, while the Rev -1 group had an abortion rate of 27.2%. On the other hand, we achieved the isolation of the 70% virulent strain of the goats of the immunogen group. The results show that the immunogen does not exceed the protection conferred by the current Rev-1 vaccine.

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de origen bacteriano que afecta a diferentes especies de animales. Es la zoonosis bacteriana más importante a nivel mundial (Godfroid *et al.*, 2011). Causada por bacterias del género *Brucella*, cada especie de esta bacteria tiene especificidad por ciertos hospederos animales, aunque la mayoría de ellas también son capaces de infectar a otras especies animales (OIE, 2011). La enfermedad está presente prácticamente en todo el mundo, con excepción de algunos países del occidente y norte de Europa, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda que se consideran libres de brucelosis (Aguilar, 2010; Neta *et al.*, 2010; Olsen y Tatum, 2010). En los pequeños rumiantes, el agente principal de la brucelosis es *B. melitensis*, un bacilo Gram negativo, intracelular facultativo que causa una importante falla reproductiva en los animales infectados, además es considerada la especie de *Brucella* con mayor virulencia para el ser humano (Byndloss y Tsolis., 2016). En su hospedero natural la enfermedad es adquirida principalmente por el consumo de leche y alimento contaminado con secreciones eliminadas durante el parto o el aborto, la signología principal en estos animales son fallas reproductivas como abortos, mortinatos, nacimiento de crías débiles e incluso infertilidad. Mientras que los humanos pueden contraer la enfermedad por el contacto directo con tejidos o sangre de animales infectados, la forma indirecta, es decir el consumo de leche o productos lácteos no pasteurizados que proviene de animales infectados es la principal forma de adquirir la enfermedad (Waqas *et al.*, 2016), los humanos se consideran hospederos accidentales y en ellos la enfermedad se manifiesta con fiebres ondulantes, mialgias y problemas articulares principalmente.

La brucelosis constituye una barrera para el comercio de los animales infectados y sus productos, debido al riesgo que *Brucella* spp. representa para la salud pública por ser una zoonosis. Desafortunadamente en la actualidad no existen tratamientos efectivos para contrarrestar los efectos de la brucelosis en los animales, por lo que los enfoques actuales se encaminan a la detección y

eliminación de los animales infectados así como el desarrollo de medidas preventivas en forma de nuevas opciones de vacunación que sean más seguras y efectivas, las vacunas que actualmente están disponibles presentan una serie de desventajas que limitan su uso seguro y efectivo, ya que se trata de vacunas vivas, que mantienen un grado de virulencia residual, pueden provocar aborto cuando se aplican a animales gestantes y las cepas vacunales pueden provocar la enfermedad en el hombre. Las nuevas herramientas genómicas han ayudado a identificar antígenos con características inmunogénicas, estructurales y funcionales deseables que se pueden usar en la preparación de vacunas que limiten los riesgos inherentes de las vacunas vivas (Gomez *et al.*, 2013). El objetivo de este trabajo fue analizar la protección que confiere un inmunógeno diseñado con proteínas purificadas de *B. melitensis* más un adyuvante y compararlo con la vacuna que con más frecuencia se usa en cabras.

1.1. Antecedentes de la brucelosis en México

La brucelosis es una enfermedad sistémica causada por una bacteria intracelular facultativa del género *Brucella* spp. que afecta a una gran variedad de mamíferos incluido el hombre. En sus hospederos naturales la enfermedad se caracteriza por producir problemas agudos sobre todo de tipo reproductivo, como abortos en el último tercio de la gestación, nacimiento de crías débiles o mortinatos, disminución en la producción láctea, placentitis, endometritis y retención placentaria (Byndloss y Tsohis 2016; Rossetti *et al.*, 2017), en los machos puede provocar orquitis y epididimitis, aunque con una menor frecuencia (Byndloss and Tsohis 2016). Por otro lado, el humano contrae la enfermedad principalmente por consumo de leche o productos lácteos no pasteurizados, que provienen de animales infectados (Waqas *et al.*, 2016); sin embargo, la enfermedad también representa un riesgo para el personal que trabaja con los animales infectados, tales como ordeñadores, médicos veterinarios, trabajadores de rastros y un grupo más que tiene factores de riesgo es el personal de laboratorio que trabaja directamente con las cepas vivas de *Brucella* spp. En el hombre los signos clínicos más comunes de la brucelosis son fiebres recurrentes y dolor articular en la fase aguda, aunque si no hay un

diagnóstico oportuno y no se trata, la enfermedad progresa a la fase crónica y puede provocar también problemas más serios como hepatomegalia, esplenomegalia, endocarditis y meningitis (Byndloss y Tsolis 2016), la enfermedad en el hombre tiene diferentes sinonimias dependiendo de los síntomas clínicos principales y la zona geográfica: Fiebre de Malta, fiebre del Mediterráneo, fiebre ondulante, fiebre de Gibraltar, fiebre de roca y fiebre napolitana, entre otros.

Mientras que en países industrializados los casos de brucelosis en humanos han sido controlados con gran éxito, la enfermedad continúa siendo un problema de salud pública en países en vías de desarrollo de regiones como el mediterráneo, Asia, África y América Latina (Fig. 1) (Pappas 2014). Anualmente se registran en promedio 500,000 nuevos casos alrededor del mundo; sin embargo, se cree que estos datos podrían estar muy por debajo de los casos reales (Guzmán *et al.*, 2016; Rossetti *et al.*, 2017). En países subdesarrollados o donde los ingresos económicos son menores, es donde las medidas y estrategias para erradicar la enfermedad parecen más difíciles de implementar ya que son costosas, tardadas y requieren muchos esfuerzos por parte de los sectores de salud (Zhang *et al.*, 2018). México se considera un país endémico de la enfermedad y en él es una de las zoonosis bacterianas más importantes a nivel nacional junto con la leptospirosis y la rickettsiosis, ya que se presentan alrededor de dos casos por cada 100,000 habitantes (Guzmán *et al.*, 2016. Secretaria de Salud 2016), aunque se cree que el número puede estar subestimado en algunas zonas. La brucelosis ha sido reconocida en este país desde principios del siglo XX y fue asociada con la importación de cabras provenientes de España.

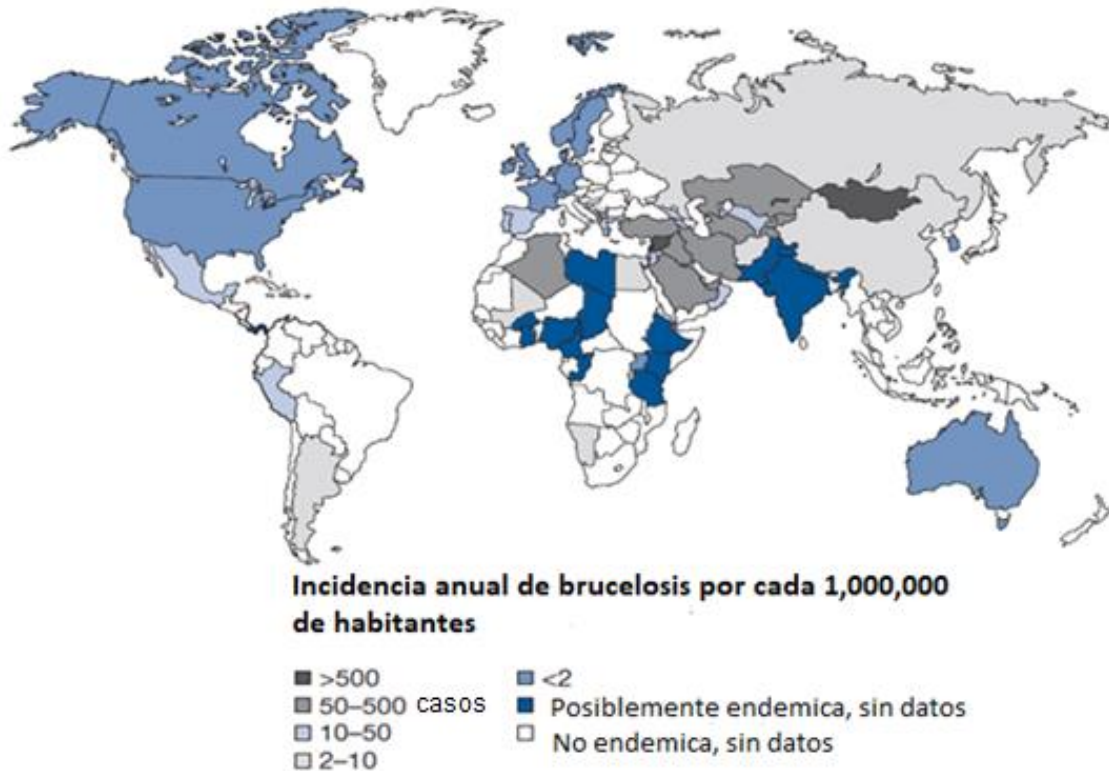


Fig. 1. Incidencia anual de brucelosis a nivel mundial. Modificado de Pappas 2014.

Actualmente la enfermedad en los animales se presenta en gran parte del territorio nacional, siendo solo los estados de Sonora y Baja California Sur reconocidos como libres, mientras que algunos estados como Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Colima, Guerrero, Nayarit y algunas regiones de Aguascalientes, Chiapas, Guanajuato, Puebla e Hidalgo se encuentran en fase de erradicación, (Fig. 2) (SENASICA, 2019).

Hasta el día de hoy se reconocen doce especies de *Brucella*, las cuales afectan con mayor predilección a ciertos hospedadores (Osman *et al.*, 2016). Sin embargo, son tres las especies con mayor relevancia ya que provocan la mayoría de los casos de brucelosis a nivel mundial y son también las más virulentas para el ser humano; *B.melitensis*, *B.abortus* y *B. suis* que afectan principalmente a los pequeños rumiantes, a los bovinos y a los cerdos respectivamente (Rossetti *et al.*, 2017).



Fig. 2. Situación actual del control de la brucelosis bovina en México. Tomado de Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (<https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-brucelosis-en-mexico>).

1.2. Brucelosis caprina

Las cabras son afectadas principalmente por *Brucella melitensis*, aunque pueden infectarse con cualquier otra especie lisa de *Brucella*, lo que se conoce como infección cruzada, principalmente en aquellos lugares donde conviven con otras especies animales como los bovinos (Martínez *et al.*, 2002; Godfroid *et al.*, 2011; Rosetti *et al.*, 2015; Byndloss y Tsolis 2016). Al igual que ocurre en otros animales, la principal forma de infección es a través de la vía oral (Poester *et al.*, 2013) y solo se necesitan entre 10-100 Unidades formadoras de colonias (UFC) para establecer una infección en los animales susceptibles, dependiendo de la vía de entrada de la bacteria (Rosetti *et al.*, 2015), cuando la infección ocurre en

animales gestantes, la bacteria coloniza la placenta y el feto provocando aborto en el tercer tercio de la gestación, siendo este el signo característico de la enfermedad, sin embargo, también puede haber mortinatos y el nacimiento de crías débiles (Rosetti *et al.*, 2015). Aunque no todos los animales infectados abortan, todos ellos eliminan grandes cantidades de la bacteria al medio ambiente en las secreciones del parto, por lo cual los animales infectados representan un gran riesgo, no solo para los animales del rebaño, sino que también para el personal que los maneja (Poester *et al.*, 2013). Todas estas afecciones repercuten en la producción de los animales y por lo tanto en la economía de la industria ganadera.

1.2.1. Etiología

Las bacterias del género *Brucella* pertenecen a las $\alpha 2$ proteobacterias, que están estrechamente relacionadas con patógenos que afectan a las plantas o son patógenos oportunistas como *Agrobacterium* y *Ochrobacter* respectivamente, y tiene una relación más lejana con especies de *Bartonella*, (Pappas 2014; Martirosyan *et al.*, 2011). Estas bacterias estrechamente relacionadas filogenéticamente comparten varias características que les ayudan en sus mecanismos de patogenicidad. Por ejemplo, la mayoría tienen un sistema de secreción tipo IV, un sistema regulador de dos componentes y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) que son débiles activadores de los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés) (Zhao *et al.*, 2018). Basado en estudios de hibridación DNA-DNA, el género *Brucella* spp es un grupo altamente homogéneo con miembros que muestran más del 50% de identidad de DNA (Theron y Thantsha, 2014). *Brucella* es un bacilo corto aerobio Gram negativo, no móvil, intracelular facultativo, que carece de los factores de virulencia clásicos encontrados en otras bacterias, tales como las toxinas, flagelos, cápsula entre otros (Guzmán *et al.*, 2016). Estas bacterias son capaces de vivir, reproducirse y persistir dentro de las células del hospedero (Kulakov, 2015), además puede soportar ambientes con un bajo pH, una baja concentración de nutrientes y la presencia de especies reactivas de oxígeno (Czyz *et al.*, 2017).

Este género ha desarrollado varios mecanismos de adaptación, que incluyen la producción de varios mecanismos de reparación, sistemas reguladores y enzimas (Theron y Thantsha, 2014). Al igual que todas las bacterias Gram negativas se conforma de un citoplasma que está rodeado por una envoltura celular la cual consta de la membrana interna, un periplasma y la membrana externa. Esta última está formada de dos tipos de antígenos principales, el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas solubles en detergentes, conocidas como proteínas de membrana externa (OMP por sus siglas en inglés) (Ducrotoy *et al.*, 2016).

Las especies se clasifican de acuerdo con la aparente preferencia que tienen por diferentes hospederos animales y su patogenicidad (Ficht y Garry, 2009), se tenía la idea que este género era exclusivo de animales terrestres hasta el aislamiento de mamíferos marinos en los 90's, actualmente se reconocen doce especies dentro del género *Brucella* que varían en su fenotipo, virulencia y adaptación a su huésped natural (Kulakov, 2015, Godfroid *et al.*, 2016). *B. abortus* afecta principalmente a los bovinos; *B. suis* infecta a los cerdos, conejos y ciervos; *B. melitensis*, pequeños rumiantes; *B. neotomae*, ratas de madera del desierto; *B. ovis*, oveja; *B. canis*, perros; *B. ceti*, mamíferos marinos cetáceos; *B. pinnipedialis*, mamíferos marinos pinnípedos; y *B. microti*, topillos comunes. Un hospedero específico para *B. inopinata* permanece sin identificar, mientras que las nuevas especies *B. papionis* infecta primates (babuinos *Papio* spp.) (Whatmore 2016) y *B. vulpis* que fue aislada de un nódulo linfático de zorro rojo (Scholz, 2016). Hasta ahora se ha logrado aislar *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* de los seres humanos y por lo tanto se demuestra que estas especies son patógenas para el humano. Aunque *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, y *B. inopinata* también se han logrado aislar en un caso de un implante en humanos (Kulakov *et al.*, 2015)

En las cabras *B. melitensis* es el principal agente implicado en la brucelosis, estructuralmente el LPS de este género bacteriano puede ser liso o rugoso, esto depende de la presencia en el primero o ausencia en el segundo de una sección larga de polisacáridos, el polisacárido O, también conocido como cadena O (Ducrotoy *et al.*, 2016). En *B. melitensis* la estructura del LPS es lisa y se forma

por el lípido A, que se inserta a la membrana externa, y del otro extremo se une a un polisacárido que consta de dos secciones: el oligosacárido nuclear y el polisacárido O.

1.2.2. Epidemiología

Como se mencionó anteriormente, *B. melitensis* se considera la especie de este género más virulenta para el ser humano y las cabras y ovejas son los hospederos naturales de la bacteria. Los animales adquieren la infección principalmente por la exposición a fluidos que son eliminados durante el parto o aborto de un animal infectado. Sin embargo, la bacteria puede permanecer viable por meses en el medio ambiente, especialmente en condiciones de frío y humedad, representando un riesgo para los animales del rebaño, ya que pueden adquirir la enfermedad de manera indirecta. Además, las hembras que paren crías sanas eliminan a la bacteria en la leche y los cabritos pueden infectarse a través de esta vía (Díaz., 2013). En este escenario, los animales que son portadores latentes hacen que la enfermedad sea aún más difícil de erradicar, ya que la bacteria permanece sin inducir una respuesta inmune detectable, por lo que estos animales son portadores “silenciosos” de la enfermedad y representan un riesgo para la diseminación de la bacteria. La prevalencia de la enfermedad varía de un país a otro y en las diferentes regiones dentro de un país, por lo cual hoy en día millones de cabras y casi la mitad de la población humana vive en zonas de riesgo (Fig. 3) (Rossetti *et al.*, 2017), como es de esperarse la prevalencia de la brucelosis humana está ligada a aquellas regiones donde ocurre la brucelosis en los animales (Rossetti *et al.*, 2017).

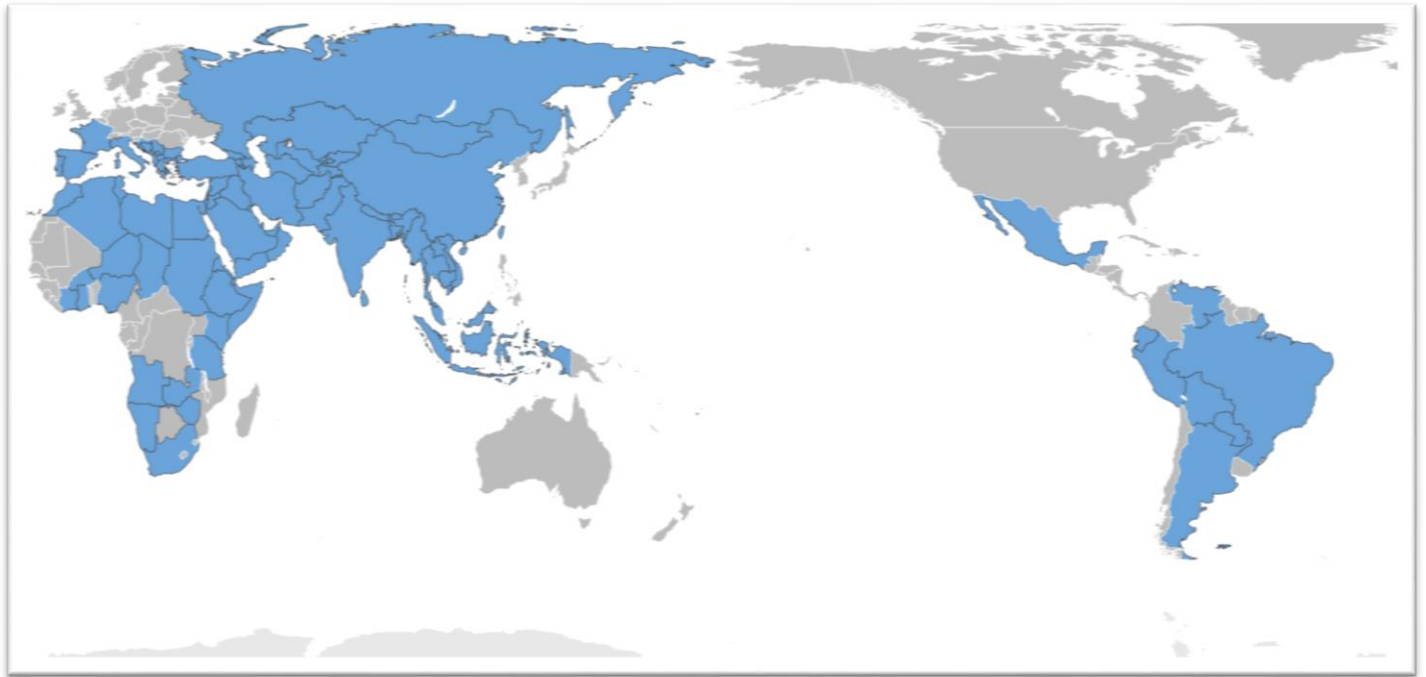


Fig. 3 Países donde se reconoce la presencia de la brucelosis caprina. (Rossetti et al., 2017).

Los estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo de transmisión de la enfermedad está estrechamente relacionado a prácticas de comercio internacional y local de animales vivos y productos derivados, principalmente productos lácteos y el manejo que se les da a estos, así como el crecimiento de la población y una convivencia cada vez más estrecha con zonas rurales donde hay rebaños (Theron y Thantsha, 2014). A nivel mundial hay cuatro regiones principales con alto riesgo, de acuerdo con los datos epidemiológicos: el Medio Oriente, Asia central, partes de América Latina y el Mediterráneo, principalmente en la península de los Balcanes. A pesar de ello, en varias regiones sub-Saharianas de África hay información limitada sobre la prevalencia de la enfermedad debido a las carencias en los sistemas de vigilancia veterinaria y la falta de instalaciones para el diagnóstico de la enfermedad. Los factores que influyen en la prevalencia de la enfermedad incluyen el sistema de producción, las zonas agroecológicas, las prácticas agropecuarias, la fauna silvestre, entre otros. En general en los países

desarrollados los programas de diagnóstico-sacrificio, junto con la compensación para los productores, la acreditación e incentivos para producciones libres de la enfermedad han permitido el control de la enfermedad y a sí mismo estimulan a los productores a intentar lograr el estatus (Godfroid *et al.*, 2011). No obstante, las estrategias y medidas de control son difíciles de implementar en países en vías de desarrollo donde la enfermedad es más frecuente, debido a que los programas son costosos, requieren mucho tiempo y mano de obra. Por estas razones, actualmente es necesario el desarrollo de medidas de control y prevención que sean más efectivas, como nuevas vacunas, técnicas de diagnóstico más sensibles y específicas, un mejor control en el movimiento de animales, así como de sus productos, todo con el fin de controlar y erradicar la brucelosis (Rossetti *et al.*, 2017). Se estima que esta enfermedad está subdiagnosticada en todo el mundo, debido a que los países en donde la prevalencia es alta se da prioridad a otras enfermedades, la infraestructura de los servicios de salud es insuficiente e incluso carecen de pruebas diagnósticas o laboratorios de referencia.

En los animales la enfermedad tiene importancia en la economía ya que genera pérdidas por los abortos producidos y la disminución en la producción de leche de los animales afectados, además de las barreras comerciales que implican para los animales o sus productos que provienen de rebaños positivos a la enfermedad (Waqas *et al.*, 2016).

La disminución de los casos en los humanos depende del control de la enfermedad en los animales, de ahí la importancia de crear medidas que ayuden a contener los casos de brucelosis animal, siendo las campañas vacunación de los animales una de las principales herramientas para este fin (Godfroid *et al.*, 2011; Dorneles *et al.*, 2015; Higgins *et al.*, 2017). También se sugieren los regímenes de pruebas diagnósticas y el sacrificio de los animales positivos a la enfermedad, pero como se mencionó anteriormente, es una práctica que no puede aplicarse a nivel global y menos aún en países en vías de desarrollo, que paradójicamente son los que tienen el problema en una escala mayor (Boschioli *et al.*, 2001; Ducrotoy *et al.* 2016).

1.2.3. Patogenia

La infección se adquiere a través de la vía oral principalmente, aunque también puede ser adquirida mediante inhalación y por contacto directo del microorganismo con lesiones en la piel (Osman *et al.*, 2016). Un paso clave en la patogenia de esta bacteria es la capacidad que tiene para invadir múltiples células ya sean fagocíticas o no fagocíticas. Cuando la infección se adquiere por la vía oral las células M de la mucosa intestinal, y los fagocitos intraepiteliales juegan un papel importante ya que favorecen la migración transepitelial y el transporte a la lámina propia y a la submucosa (Neta *et al.*, 2010).

La capacidad que tiene *Brucella* spp de invadir distintos tipos de células explica las manifestaciones clínicas y la patogenia de la brucelosis; así mismo, el curso crónico hacia el que tiende la enfermedad se puede revelar por la habilidad del patógeno de evadir la respuesta inmune innata del huésped, modular las funciones de este sistema y mantener las condiciones óptimas que le permiten reproducirse dentro de la célula huésped (Kulakov 2015). La invasión y replicación en los trofoblastos placentarios en hembras gestantes dan como resultado los problemas reproductivos (Figueiredo *et al.*, 2015), mientras que la persistencia dentro de los macrófagos disemina a la bacteria a diferentes localizaciones del cuerpo y conduce a la fase crónica de la enfermedad (Ficht y Garry, 2009; Godfroid *et al.*, 2011; Elfaki *et al.*, 2015), también tiene la capacidad de infectar células no fagocíticas, aunque los mecanismos en estas células no están claros (Corbel, 1997). Una característica de las bacterias del género *Brucella* es su habilidad para replicarse ampliamente en las células sin alterar las funciones básicas de esta o sin infringir un daño obvio a la célula (Gorvel *et al.*, 2002). La bacteria ha desarrollado varias estrategias para resistir y escapar de los mecanismos de muerte de las células fagocíticas, así como para interferir con el inicio de la respuesta inmune del hospedador (Martirosyan and Pierre., 2013).

Aunque *Brucella* spp. no cuenta con los mecanismos clásicos de virulencia, se han descrito algunos medios que le ayudan en su patogenia, por ejemplo, este patógeno es capaz de resistir la acción lítica de muchas sustancias bactericidas;

esta particularidad es otorgada por las características de la envoltura celular de la bacteria, que es altamente hidrofóbica en comparación a la de otras bacterias Gram negativas (Martirosyan *et al.*, 2011). De hecho, la membrana externa de *Brucella* spp. está formada por fosfolípidos, lípidos de ornitina, lipoproteínas y moléculas de lipopolisacáridos no canónicos sustituidas con cadenas de hidrocarburos alifáticos muy largas. El lípido A y el oligosacárido central de *Brucella* LPS (Br-LPS) tienen un número reducido de azúcares cargados negativamente, además de una cadena de ácidos grasos mucho más larga que otras bacterias Gram negativas; lo que les permite evadir el reconocimiento por los TLR-4, los cuales constituyen parte importante del reconocimiento de PAMP's por parte de la inmunidad innata (Barquero *et al.*, 2007). Igualmente, la cadena O y los polisacáridos relacionados se construyen a partir de homopolímeros de azúcares N-formil perosamina no reductores. Todas estas características contribuyen a la reducción general de las cargas negativas en la superficie de las bacterias lisas. Como consecuencia a la superficie de *Brucella* no se unen defensinas microbicidas, catelicidinas o cualquier otra molécula bactericida catiónica ni el componente C3 del complemento y por lo tanto no hay síntesis de los componentes proinflamatorios C3a y C5a (Kulakov 2015).

Por otra parte, se han descrito algunas adhesinas que ayudan a la invasividad de la bacteria en células epiteliales, se han reconocido al menos dos proteínas que le ayudan a este fin: la proteína SP41 y Big A (Neta *et al.*, 2010; Czibener *et al.*, 2015). El sistema de secreción tipo IV (codificado por el operón *VirB*), el β -glucano cíclico, el LPS y el sistema regulador de dos componentes BvrS/ BvrR, son de los principales actores que le garantizan a la bacteria poder tener un estilo de vida intracelular (Martirosyan y Pierre., 2013). Así, la lista de moléculas que *Brucella* emplea para su supervivencia continúa expandiéndose y recientemente se agregaron las proteínas de tipo transportador BacA y la fosfatidilcolina (Martirosyan *et al.*, 2011).

Una vez que la bacteria se adhiere a la superficie de las células epiteliales induce una cascada de señalización que reorganiza el citoesqueleto de actina y por lo

tanto induce un rearrreglo de la membrana a lo largo de donde se sitúa el patógeno, que promueve su internalización por un mecanismo tipo “zipper” (Neta *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2015). Tras ser fagocitadas, se forma un complejo fagosomal, las vacuolas que contienen a *Brucella* spp (BCV por sus siglas en inglés) que continúan su tránsito hacia la vía endocítica, adquieren marcadores endosomales tempranos y tardíos, lo cual se detecta por la presencia de marcadores en la BCV, como la pequeña proteína de unión a trifosfato de guanosina rab5 posteriormente hay una interacción limitada con los lisosomas, paso en el cual la BCV se acidifica y menos del 10% de las bacterias sobreviven al periodo de adaptación; aquellas que sobreviven deben ser capaces de resistir un ambiente muy ácido dentro de los fagosomas; cabe destacar que la acidificación de las BCV es un paso necesario para que *Brucella* spp active la expresión de algunos genes, entre los cuales destaca el operón VirB, que depende del sistema de secreción tipo IV (SSTIV), sistema por el cual algunas proteínas con funciones efectoras son secretadas y ayudan a la bacteria a inhibir la unión de la BCV con enzimas proteolíticas, a dirigirse hacia un escape de la vía endocítica y establecer una nicho replicativo, es aquí donde 48 horas posteriores a la infección la bacteria empieza a replicarse finalmente (Case y Samuel., 2015), (Fig. 4).

Hasta el momento son pocas las proteínas identificadas que son secretadas por el SSTIV y a las cuales se les ha encontrado una función específica en la patogenia de la bacteria. Por ejemplo, se han identificado las proteínas BtpA y BtpB las cuales se unen a factores de transcripción y finalmente inhiben la producción de citocinas pro-inflamatorias (Kulakov 2015). Se ha demostrado que este sistema es necesario para controlar el tránsito intracelular y la sobrevivencia dentro de las células hospederas, pero no para la invasión inicial (Martirosyan *et al.*, 2011). Aunque no se sabe a ciencia cierta los mecanismos implicados, se forma otro compartimento llamado aBCV (de sus siglas en inglés autophagic *Brucella*-Containig Vacuole) asociado con el retículo endoplásmico a partir del cual un grupo de bacterias puede ser liberado e infectar a nuevas células (Case and Samuel., 2015).

Otra molécula necesaria para el control del tráfico intracelular de *Brucella* spp. es el Glucano β -cíclico (c β G por sus siglas en inglés), que es un polisacárido que abunda en el espacio periplásmico de la bacteria y juega un papel en la osmoregulación de la envoltura celular de estas bacterias (Amjadi *et al.*, 2019). De manera simultánea las BCV adquiere el marcador Lamp-1, a pesar de ello, la fusión con el endosoma tardío de esta vía no se lleva a cabo, lo cual queda demostrado por la carencia de marcadores tardíos como la pequeña proteína de unión a trifosfato de guanosina rab7, por el contrario, la BCV adquiere marcadores del retículo endoplásmico (RE) como la calreticulina o la calnexina. En este punto la bacteria alcanza un nicho seguro que le permite replicarse y sobrevivir (Celli 2019).

Para establecer una infección crónica *Brucella* spp tiene varias estrategias como la evasión de la destrucción intracelular inhibiendo la fusión fagolisosoma, es capaz de remodelar su envoltura celular, adaptar sus vías metabólicas y su respiración; durante estos procesos la bacteria no secreta moléculas que sean dañinas para la célula como exotoxinas o endotoxinas, tampoco escapa hacia el núcleo o el citosol de la célula hospedadora, si no que permanece dentro de la BCV, además la infección por *Brucella* inhibe la apoptosis exógena de las células mononucleares infectadas mediada por Fas ligando o INF- γ (Martirosyam *et al.*, 2011).

Otra forma en la que la bacteria modula la respuesta inmunológica del hospedero es evitando la maduración de células dendríticas, lo que se caracterizan por la disminución de la expresión de moléculas de superficie como el MHC II, lo que disminuye la presentación de antígenos y a su vez evita la activación de las células T *naïve*, finalmente estas células producen bajas cantidades de IL-12 y TNF- α (Martirosyam *et al* 2011; Figueiredo *et al.*, 2015.), aunque en algunos trabajos se ha encontrado que esta bacteria no afecta la expresión de CD 80 y CD86, si disminuye la expresión de CD83 y por lo tanto impide la maduración de las células dendríticas, esta actividad se cree que se debe en parte al LPS y a la proteína btp1 (Gorvel *et al.*, 2014). *Brucella* spp. es capaz de remodelar su envoltura celular, adaptar sus vías metabólicas y su respiración. Durante estos

procesos la bacteria no secreta moléculas que sean dañinas para la célula como exotoxinas o endotoxinas, tampoco escapa hacia el núcleo o el citosol de la célula huésped, si no que permanece dentro de la BCV.

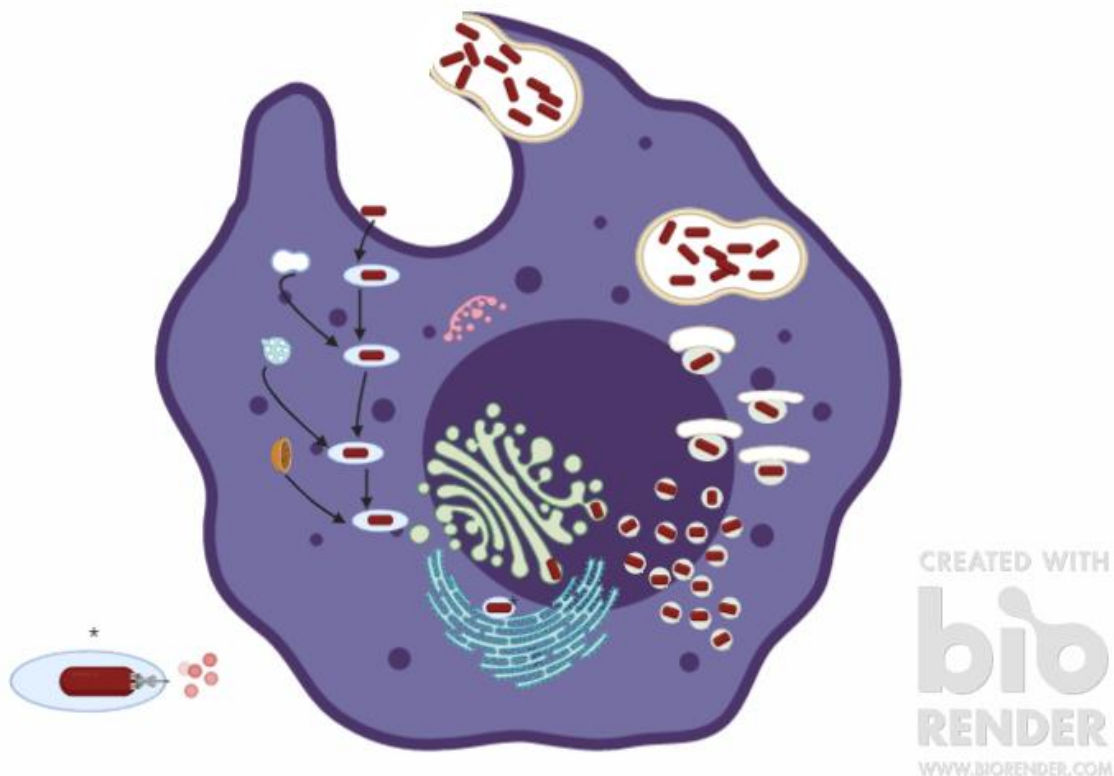


Fig. 4. Tránsito intracelular de *Brucella spp*: Tras ser fagocitada la bacteria circula normalmente por la vía endocítica adquiriendo marcadores endosomales tempranos (small GTPase, Rab5, EEA-1) y tardíos (LAMP2, CD63, y small GTPase Rab7), se forma entonces la BCV. La vacuola tiene una ligera interacción con los lisosomas y se acidifica, entonces se forma la eBCV, a continuación, la eBCV pierde los marcadores endosomales y después interactúa con el RE e incluso adquiere marcadores del RE como la calreticulina, calnexina y Sec61 β . En este punto las vacuolas incluso tienen características funcionales del RE es aquí donde comienza la replicación de la bacteria, lo que indica que este organelo provee condiciones para la replicación de la bacteria. Estas se llaman rBCV. Las rBCV interactúan con el RE y también interactúan con el tráfico vesicular entre el RE y el aparato de Golgi. Después de una replicación extensiva hay una captura progresiva de membranas y se forman vacuolas multimembranas que se asemejan a los autofagosomas. Tienen características endo y lisosomales, se llaman aBCV. Finalmente, una vez que se forma la aBCV se asocia con la liberación de la bacteria y el ciclo bacteriano se cumple

1.2.4. Signos clínicos

En las cabras la enfermedad suele tener una presentación clínica aguda, que es quizá la forma más reconocida; los signos clínicos que se presentan en esta forma involucran principalmente los reproductivos como aborto en el tercer tercio de la gestación, retención placentaria, metritis, nacimiento de crías débiles, infertilidad y en raros casos puede provocar orquitis y epididimitis en los machos (Ficht y Garry 2009; Elfaki *et al* 2015; Osman *et al.*, 2016).

En la fase crónica la enfermedad puede tener múltiples presentaciones dependiendo el órgano que afecte. En estos casos la artritis suele ser la forma más común de presentación de la enfermedad, aunque pueden verse afectados órganos como hueso, sistema nervioso central, hígado y bazo en donde la inflamación y patología asociadas inducirán los signos clínicos específicos (Ficht y Garry, 2009; Elfaki *et al.*, 2015).

1.2.5. Inmunopatología

En la lucha por sobrevivir los mamíferos han evolucionado en la eficacia de su sistema inmunológico para la detección de agentes patógenos que pueden dañar la supervivencia de un organismo, por otro lado, los microorganismos también han mejorado los mecanismos para evadir estas armas del sistema inmunológico (Martirosyan y Pierre., 2013).

En la respuesta inmunológica hacia *Brucella* spp, las células T CD4+ y CD8+ parece que son el grupo celular clave en el combate de la infección, a través de diferentes funciones, primero están implicadas en la secreción de IFN- γ que a su vez activa la función bactericida de los macrófagos, en segundo lugar, activa a los linfocitos T citotóxicos y contribuye al cambio de isotipo de IgG2 a IgG3 (Byndloss and Tsolis., 2016; Ducrotoy *et al.*, 2016). Aunque el mecanismo preciso de eliminación de *Brucella* spp. no está completamente claro, algunas moléculas como las perforinas, el TNF- α y el IFN- γ juegan un papel central en lograr el control de la infección (Schurig *et al.*, 2002),

También hay citocinas que participan de manera importante en el combate contra la brucelosis y que ayudan tanto en la respuesta inmune innata como la adaptativa; la IL-12 que producen las células B y los macrófagos conduce a la secreción de IFN- γ , que como se mencionó anteriormente mejora la función microbicida del macrófago; en los esplenocitos de huéspedes infectados se ha encontrado niveles altos de IL-2, IFN- γ e IL-10 y bajos niveles de IL-4 lo que es consistente con una respuesta Th1. Sin embargo, la IL-10 puede contribuir al establecimiento de *Brucella* spp., lo cual podría explicar por qué aún con este tipo de respuesta, en muchos casos el hospedero no es capaz de eliminar la infección (Schurig *et al.*, 2002), por lo cual el nivel de citocinas no es un aspecto cien por ciento confiable cuando se trata de encontrar hospedadores resistentes.

Las células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) son responsables del inicio, la magnitud y la calidad de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, algunas bacterias, como *Brucella* spp. han desarrollado mecanismo que alteran las funciones de estas células y por ende todo el proceso de la respuesta inmune adaptativa. Se sabe que las DC infectadas con esta bacteria muestran un fenotipo inmaduro, que se caracteriza por la baja expresión en la superficie de moléculas coestimuladoras MHC-II, CD80 y CD86. Esto conduce a las células a la inhibición de la maduración funcional con la ausencia en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 y TNF- α y una inadecuada presentación de antígenos a las células T *naïve*. La respuesta inmune adaptativa es indispensable para el combate contra patógenos como *Brucella* spp., como se mencionó antes las citocinas producidas durante la fase aguda de la infección son determinantes en el curso que tomara la enfermedad, de este modo las citocinas como el INF- γ , el TNF- γ y la IL-12 desvían la respuesta hacia un perfil TH-1. No obstante, la bacteria tiene la capacidad de contener esta respuesta, inhibiendo la secreción de IL-12 que a su vez altera la expresión de moléculas coestimuladoras de las DC y por lo tanto la actividad de los linfocitos T se ve comprometida, así como la producción de IFN- γ , con lo cual los macrófagos son menos eficientes para poder eliminar a la bacteria y esta finalmente logra establecer una infección crónica (Figueiredo *et al.*, 2015).

1.2.6. Diagnóstico

Debido a la importancia en salud pública por tratarse de una zoonosis, en cualquier caso, de aborto en caprinos en el tercer tercio de la gestación debe sospecharse de brucelosis y diferenciarse de otras enfermedades abortivas (Neta *et al.*, 2010).

La “prueba de oro” para el diagnóstico de la brucelosis en pequeños rumiantes es el aislamiento de la bacteria a partir de hisopados vaginales y de la leche que son las mejores muestras que hay para el cultivo, también puede aislarse a partir del bazo y nódulos linfáticos en la necropsia. Sin embargo este método presenta una serie de desventajas que limitan su uso en la práctica clínica veterinaria a gran escala, ya que tiene una baja sensibilidad debido a que la prueba puede no detectar la bacteria cuando se encuentra en pequeñas cantidades en las muestras o si esta última está contaminada con otros microorganismos, además representan un riesgo para el personal de laboratorio, aunque existen otros métodos directos para el diagnóstico de la brucelosis caprina como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), la cual tiene mayor sensibilidad que el aislamiento y es una buena opción sobre todo en muestras con una baja cantidad de bacterias, la inmunohistoquímica también es un método directo para el diagnóstico de la brucelosis (European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General., 2001; Xavier *et al.*, 2009; Neta *et al.*, 2010). La principal desventaja de estos métodos son los costos que representan para los productores, por lo cual su uso se limita a la investigación y con fines epidemiológicos (Martínez *et al.*, 2002).

También existen las pruebas inmunológicas las cuales se basan principalmente en la detección de anticuerpos contra el LPS del microorganismo, ejemplos de estas pruebas son la prueba de tarjeta al 3%, la fijación del complemento y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Estas pruebas tienen la ventaja de ser más rápidas, y que pueden realizarse en poblaciones de animales relativamente grandes, además de ser más económicas, aunque, la desventaja que presentan es que no pueden diferenciar animales que han sido vacunados de

aquellos que están infectados, puede no detectar a los cabritos recién nacidos infectados de hembras con la enfermedad, además puede haber reacciones serológicas falsas positivas provocadas por *Yersinia enterocolitica* O:9 y otras bacterias Gram negativas (Ducrotoy *et al.*, 2016).

La Norma Oficial Mexicana contra la brucelosis en los animales (NOM-041-ZOO-1995) establece las pruebas de tarjeta al 3% y fijación del complemento como pruebas oficiales para la detección de anticuerpos contra la brucelosis en los pequeños rumiantes.

1.2.7. Profilaxis y tratamiento

Hasta el día de hoy los programas de vacunación permanece como uno de los métodos más efectivos para la prevención de las enfermedades infecciosas, por lo cual el desarrollo de vacunas más efectivas y seguras continúa siendo un reto para los investigadores en la actualidad (Denisov *et al.*, 2010) y más aún el desarrollo de vacunas contra patógenos intracelulares. No obstante, hay algunos patógenos que representan un desafío ya que la sola aplicación de programas no ha sido suficiente para el control de la enfermedad.

Este es el caso de la brucelosis que solo ha sido erradicada en algunos países desarrollados en los cuales los programas de vacunación fueron acompañados del sacrificio de animales positivos, aunque, son programas que no pueden ser implementados en países con bajos recursos, debido a la gran demanda económica que requieren. Por lo cual la búsqueda de nuevos inmunógenos con mejores características de protección sigue siendo una de las alternativas más viables (Higgins *et al.*, 2017).

El objetivo principal de las vacunas es la de prevenir la enfermedad en los hospederos del agente patógeno de modo que actualmente la vacunación continúa siendo una de las principales herramientas para la prevención de la brucelosis (Ficht y Garry, 2009), además la vacuna ideal debe iniciar una respuesta inmune innata capaz de dirigir la respuesta inmune adaptativa hacia la

eliminación e inactivación eficiente del patógeno seguido del desarrollo de memoria inmunológica (Pasquale *et al.*, 2015).

Históricamente las vacunas que se han desarrollado para prevenir la brucelosis han tenido muy poco éxito, incluyendo las vacunas de bacterias inactivadas por calor y los extractos crudos, la razón principal por la cual han fallado es que son pobres inductoras de una respuesta inmune Th1 en comparación con las vacunas vivas atenuadas (Schurig *et al.*, 2002), aunado a que se requiere de una mejor comprensión de la respuesta inmune que provoca las vacunas y la infección.

La vacuna que actualmente está aprobada (*B. melitensis* Rev-1) para prevenir la enfermedad en las cabras presenta una serie de desventajas para su uso seguro en los animales, algunas de estas limitantes son su uso seguro en animales gestantes en los cuales puede provocar aborto, interfieren con las pruebas diagnósticas convencionales, representan un riesgo de infección hacia al hombre (Gomes *et al.*, 2006). Por otro lado, esta vacuna también presenta varias ventajas, por lo cual los nuevos prototipos de inmunógenos deben desechar los detrimentos y tener las virtudes de la vacuna viva. Sin embargo, el desarrollo de estas vacunas tiene una base empírica, en el entendido de que actualmente se están investigando las bases moleculares implicadas en la atenuación de las cepas vacunales (Issa y Ashhba, 2016; Salmon y Kornspan, 2020) . Actualmente se están haciendo esfuerzos para el diseño de vacunas que tengan un diseño racional y no presenten las desventajas de la vacuna Rev-1. Por otro lado, el desarrollo de estas vacunas se ha visto frenado por el conocimiento incompleto de los antígenos protectores de *Brucella* spp (Schurig *et al.*, 2002), que promuevan el desarrollo de una respuesta inmune celular esencial para la eliminación del patógeno intracelular, pero se sabe que induce altos niveles de IFN- γ , aunque el mecanismo molecular por el cual ejerce este efecto aún se desconoce (Yingst y Hoover 2008).

En la respuesta inmune hacia *Brucella* spp. mediada por anticuerpos parece ser menos efectiva ya que solo es capaz de eliminar a los microorganismos que se encuentran en circulación, mientras que la respuesta inmune mediada por células

en donde participan los macrófagos activados y los linfocitos parece ser más eficaz (Schurig *et al.*, 2002).

En algunos trabajos en donde se han usado ratones “knockout” CD 8^{-/-} y/o CD 4^{-/-} quedó demostrado el papel fundamental que llevan a cabo estas células en la protección del hospedero contra este agente (Clapp *et al.*, 2016). Esta última es estimulada por las vacunas vivas o por múltiples inyecciones de los antígenos protectores junto con adyuvantes.

Varios componentes de superficie e intracelulares así como antígenos recombinantes para inducir una respuesta inmune protectora contra *Brucella* están siendo investigados, con la finalidad de identificar aquellos antígenos que verdaderamente sean responsables de inducir una respuesta inmune mediada por células (Schurig *et al.*, 2002), algunos estudios *in vitro* como la producción de citocinas tales como IL-2, IL-12 e INT- γ , la proliferación de linfocitos específicos de antígenos, los ensayos *in vivo* (hipersensibilidad retardada), son ensayos indirectos que podrían ayudar a seleccionar los antígenos adecuados que contribuirán a la protección contra la enfermedad. La vacuna ideal contra la brucelosis, que provea una inmunidad del cien por ciento de los animales vacunados, que proteja contra todas las especies de *Brucella* y proteja a las diferentes especies animales no existe, sin embargo, también se están realizando esfuerzos del lado los adyuvantes, los cuales podrían mejorar la inmunogenicidad de las vacunas (Denisov *et al.*, 2010).

No existe tratamiento específico contra la brucelosis en los animales, aquellos animales que resultan ser positivos a alguna de las pruebas oficiales deben ser sacrificados (NOM-041-ZOO-1995), con la finalidad de disminuir los casos en los seres humanos, así como los focos de infección para el rebaño.

1.3. Proteínas BtuB, Hia y FlgK

Como se ha mencionado anteriormente, *Brucella* spp carece de los mecanismos de virulencia clásicos que se han descrito para muchos otros patógenos, además, en comparación con otras bacterias es poco lo que se sabe acerca de factores

que le ayudan a *Brucella* spp a persistir dentro de su hospedero (Seleem *et al.*, 2008). A pesar de ello, con las herramientas actuales en genómica como la proteómica, transcriptómica, inmunómica así como la disponibilidad de secuencias genómicas de varios patógenos, incluidos *Brucella melitensis*, se ha hecho posible la identificación de factores con alta probabilidad de participar en la patogenia de la enfermedad, pero que también pueden tener el potencial de ser inmunogénicos (Gomez *et al.*, 2013).

En estudios previos en los cuales se usaron estas herramientas con la ayuda del programa Vaxin® se identificaron algunas proteínas de *B. melitensis* cepa 16M que tienen el potencial de ser usados como inmunógenos. Finalmente, tras una serie de pruebas fueron seleccionadas tres proteínas BtuB, Hia y FlgK.

Hia es una proteína que tiene similitud a una adhesina y factor de colonización de *Haemophilus influenzae*. FlgK es una proteína codificada por el gen *flgK* que recientemente se ha reportado que codifica para un flagelo, pero es necesario para establecer una infección crónica en el modelo de ratón. La proteína BtuB es un autotransportador ABC el cual se ha observado que ayuda a la supervivencia de *B. melitensis* 16M en macrófagos de ratón (Gomez *et al.*, 2013).

Estas tres proteínas se administraron junto con un adyuvante de aluminosilicato para un prototipo de inmunógeno; el cual se probó en el modelo murino, en ese trabajo los resultados del análisis del perfil de citocinas que eran producidas por los esplenocitos de los animales inoculados demostraron una respuesta inmune mixta Th1 y Th2. Sin embargo, la magnitud de las citocinas secretadas hacia una respuesta Th1 como el IFN γ e IL-12 fue mayor, que las citocinas de una respuesta Th2 (IL-4, IL10 e IL-5), respuesta que es deseable cuando se desea combatir patógenos intracelulares como *Brucella* spp.

1.4. Adyuvantes

Las vacunas actúan estimulando el inicio de una respuesta inmune innata y activando a las células presentadoras de antígenos. Mientras que las vacunas que contienen un número limitado de antígenos purificados en general tienen mejor

perfil de seguridad en comparación con las vacunas vivas atenuadas, también suelen ser menos inmunogénicas debido a la remoción de las características patogénicas del microorganismo y se cree que esto es debido a la incapacidad de los antígenos purificados para inducir la maduración de las células presentadoras de antígenos. La tendencia actual en las vacunas es mejorar su inmunogenicidad al tiempo en el que disminuyen los riesgos (efectos secundarios indeseables) y es un factor clave para el desarrollo de las nuevas vacunas y la aplicación de nuevas tecnologías; sin embargo, para resolver el problema de su baja inmunogenicidad, se les añaden adyuvantes que mejoran la respuesta inmune inicial (Pasquale *et al.*, 2015).

La palabra adyuvante proviene del latín *adjuvare* que significa asistir o ayudar, esta propiedad que tienen algunos minerales y compuestos fue descubierta de manera fortuita por el médico veterinario francés Gaston Ramon quien observó que el rendimiento de antisuero de los caballos contra el tétanos y la difteria era mayor en los animales que habían desarrollado un absceso estéril en el sitio de inyección al inyectar tapioca o almidón. (Bergmann and Wolfgang 2014; Pasquale *et al.*, 2015). Sin embargo, hoy en día el mecanismo de acción de muchos adyuvantes no está totalmente claro y se han formulado múltiples hipótesis de la forma en la que pueden mejorar la respuesta inmune; creando un ambiente inmune en el sitio de inyección, produciendo la formación de depósitos, la inducción de citocinas y quimiocinas, el reclutamiento de células inmunológicas, mejorando el consumo y presentación de antígenos y promoviendo el transporte de antígenos hacia los nódulos linfáticos regionales (Awate *et al.*, 2013).

Durante muchos años los principales adyuvantes que se han usado están hechos a base de sales de aluminio, aunque su mecanismo preciso por el cual tienen el efecto adyuvante todavía permanece sin ser comprendido completamente, El efecto de depósito que anteriormente se creía que tenía, actualmente es cuestionable (Aimanianda *et al.*, 2010; Georg and Sander 2019). La evidencia que se ha acumulado en varios experimentos en modelos animales confirma que las sales de aluminio que actualmente se usan estimulan una respuesta inmune con

desviación hacia Th-2 (Georg and Sander 2019). Se ha visto que la aplicación de estos adyuvantes provoca efectos en el sitio de aplicación como la liberación de IL-1 β , CCL-2, IL-4, IL-5 e histamina, y por lo tanto el reclutamiento de leucocitos, esto en respuesta a las señales de daño en la zona (liberación de ATP, cristales de ácido úrico y DNA de las células del huésped), al provocar una muerte necrótica dependiente de catepsina B y catepsina S (Aimanianda *et al.*, 2010). Al mismo tiempo estas sales activan células dendríticas, monocitos y macrófagos, ya que estimulan la expresión de moléculas de adhesión (CD54 y CD58) y moléculas coestimuladoras (CD40 y CD86) (Georg and Sander 2019). Estas sales activan las células innatas por la vía del inflamasoma NLRP3, lo que conduce a la liberación de IL-1 β y piroptosis. Mientras que los TLR son dispensables para la activación de la respuesta innata por medio de este adyuvante (Aimanianda *et al.*, 2010).

A diferencia de las sales de aluminio actualmente usadas que favorecen una respuesta inmune Th-2, algunos adyuvantes aprobados como QS-21, MF-59 o el adyuvante completo de Freund inducen una respuesta inmune con sesgo hacia Th-1 (Toussi y Massari, 2014). Algunos otros adyuvantes actúan estimulando los PRRs, de todos estos, los TLR son los más estudiados y se ha demostrado que los ligandos de TLR pueden mejorar la calidad de la respuesta inmune adaptativa induciendo una respuesta humoral y celular cuando se usan en vacuna dirigidas contra enfermedades infecciosas (Toussi y Massari, 2014). En general la señalización a través de TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 and TLR9 promueve una respuesta inmune Th-1, mientras que la señalización a través de los TLR-2, TLR-1, TLR6 y TLR-5 favorecen una respuesta con desviación hacia Th-2. (Georg y Sander, 2019; Toussi y Massari, 2014).

El adyuvante basado en aluminio-silicato, aunque no se sabe aún cuál es el mecanismo por el cual ejerce esos efectos, se ha visto que influye en el resultado de la respuesta inmune, por ejemplo, en un trabajo en ratones se observó que favorece el perfil de citocinas Th-1, por encima del perfil Th-2 (Ficht, 2013). En trabajos *in vitro* este compuesto demostró que activa a los macrófagos, además de que se puede comportar como un superantígeno y activar a los Linfocitos T y

promover la fagocitosis de los macrófagos (Jung *et al.*, 2015). El uso de análisis de microarreglos genómicos ha demostrado que algunos adyuvantes, entre los que se encuentran las sales de aluminio, modulan la respuesta de un grupo de genes (genes de respuesta central al adyuvante) que codifican para citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, genes inducidos por interferón, receptores inmunes innatos entre otros (Awate *et al.*, 2013). En otro estudio se demostró que el tratamiento de macrófagos con aluminosilicatos modifica la expresión de genes, por un lado, regula negativamente las vías que están implicadas en el ciclo celular (Kinasas del ciclo de división celular [*Cdcs*] y las kinasas dependientes de ciclina [*CDKs*]), replicación del DNA, metabolismo de las purinas y pirimidinas). Mientras que regula positivamente genes asociados con las moléculas de adhesión celular, lisosomas, fagosomas, endocitosis y procesamiento y presentación de antígenos (Jung *et al.*, 2015). En ensayos de desafío en el modelo de ratón contra la fiebre aftosa se observó que los adyuvantes de aluminio-silicato (Cliptox®) eran capaces de proteger a más del 80% de los animales desafiados y además favorecían el cambio de isotipo de IgG1 a IgG2a e IgG2b, en comparación a los animales a los cuales se les puso una vacuna de virus inactivado sin adyuvante en el cual solo 20% de los animales tuvo una protección adecuada. Empero, no se estableció el mecanismo molecular de acción del adyuvante y en algunos mencionan que la respuesta Th-2 se ve favorecida por el uso de estos adyuvantes (Batista *et al.*, 2010).

Un importante enfoque de los adyuvantes actuales es lograr una buena inmunogenicidad, pero sin una inflamación exagerada, además de promover una fuerte respuesta por células T CD8+, sobre todo cuando se desea combatir a patógenos intracelulares (Bergmann y Wolfgang 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Las vacunas que actualmente se utilizan para prevenir la brucelosis presentan efectos adversos que limitan su uso seguro en los animales, algunas de estas limitantes son su uso en animales gestantes en los cuales puede provocar aborto,

interfieren con las pruebas diagnósticas convencionales y representan un riesgo de infección hacia al hombre.

Las cabras son los hospederos predilectos de *B. melitensis*. Por lo tanto, son la población blanco para la aplicación de vacunas que se desarrollen contra este patógeno; es importante medir la respuesta que se presenta en estos animales tras la aplicación de un inmunógeno, ya que la mayoría de los estudios se llevan a cabo en modelos murinos: adicionalmente, los ratones son animales resistentes a la brucelosis (Higgins *et al.*, 2017) y podrían mostrar resultados totalmente diferentes a los que se presentan en las cabras.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Determinar la protección conferida por un inmunógeno proteico de *B. melitensis* de tres proteínas recombinantes encapsuladas en microesferas de arcilla contra el desafío experimental y la manifestación clínica de la brucelosis caprina.

3.2. Específicos

- Analizar la secreción y expresión de citocinas por medio de PCR tiempo real.
- Verificar la protección del inmunógeno ante el desafío con una cepa virulenta de *B. melitensis* 16M.
- Observar si el inmunógeno evita la colonización de los órganos blancos de *B. melitensis*.

4. HIPÓTESIS

La vacuna de antígenos purificados unidos a partículas de aluminio-silicato promueve un perfil de citocinas con desviación hacia Th1, que es suficiente para prevenir las manifestaciones clínicas de la enfermedad en los animales, tales como el aborto y también evita la colonización de los órganos blanco de la bacteria.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Animales y diseño del experimento

Al comienzo del proyecto se adquirieron 52 cabras hembras de aproximadamente 3 meses de edad, de varias razas, que provenían de rebaños libres de brucelosis y que no habían sido vacunados contra esta enfermedad. Además, se hizo la prueba de tarjeta al 3% a todos los animales antes de comenzar el estudio para demostrar que eran seronegativos antes de comenzar el experimento.

Se crearon cuatro grupos, dos de 12 animales cada uno (grupo inmunógeno más adyuvante y grupo adyuvante) y dos grupos de 14 animales (grupo Rev - 1 y grupo PBS) a los que se le aplicaron los siguientes tratamientos:

- 1) Inmunógeno más adyuvante: se aplicó un ml del coctel de proteínas, el cual contenía 30 µg/ml de cada una de las proteínas (BtuB-Hia-Flgk).
- 2) Adyuvante: se aplicó 1 ml del adyuvante (aluminosilicato).
- 3) PBS (control negativo): se administró un ml de PBS.
- 4) Rev1 (control positivo): se administró a una dosis de $1- 2 \times 10^9$ ufc (Melirev®-N).

Todos los tratamientos fueron aplicados por la vía subcutánea a la altura del hombro del lado derecho, determinándose el día de su administración como día cero.

Las cabras fueron mantenidas en dos ubicaciones, los grupos 1 y 2 en el CENID-Salud animal e inocuidad del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) en la delegación Cuajimalpa en la Ciudad de México y los grupos 3 y 4 en el rancho San Francisco (FMVZ-UNAM), que se localiza en Chalco, Estado de México. Con la finalidad de descartar que los resultados obtenidos fueran debidos al adyuvante, el grupo de animales inoculados con éste se ingresó al estudio, porque con los antecedentes de los trabajos se observó que el adyuvante por sí solo, que está hecho de aluminio-

silicato, era capaz de estimular la producción de citocinas como el IFN- γ (Gomez *et al.*, 2015).

Se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero de todos los animales cada semana hasta el día 28 postvacunación y una muestra más el día 80, además se seleccionaron siete animales aleatoriamente de cada grupo para la toma de muestras de sangre completa anticoagulante ACD, para la extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), respectivamente.

Quince días después del último muestreo (día 95 postinmunización), los animales fueron sincronizados, empezando con la aplicación de una esponja intravaginal (CHRONOGEST® CR, laboratorio MSD salud animal), a los doce días se retiró la esponja y ese mismo día se aplicó una dosis de 300 U.I de Folligon® (MSD salud animal, análogo a la FSH). A las 24 y 48 h se usaron sementales para la detección de celos, aquellas hembras que fueran receptivas fueron inseminadas artificialmente con dos dosis de semen fresco a intervalos de 24 h.

Se realizó el diagnóstico de gestación a los treinta días, mediante ultrasonografía. En este punto se seleccionaron diez animales por cada grupo para que entraran al desafío, procurando que fueran animales gestantes, así como aquellos a los que se les había tomado sangre para extracción de células mononucleares de sangre periférica.

Diez animales de cada grupo fueron transferidos a unidades de contención (excepto en grupo Rev - 1 el cual contaba con 11 animales), localizadas en las instalaciones del CENID Salud animal e inocuidad del INIFAP, una semana antes de ser desafiadas y se mantuvieron ahí hasta el final del proyecto.

Los animales se alimentaron con alfalfa achicalada, avena henificada y concentrado. También fueron agrupadas en corrales de tamaño adecuado (formando grupos de dos a tres cabras por corral).

A los 90 días de gestación las cabras fueron desafiadas vía conjuntival con una dosis de 300 μ L de cultivo a una concentración de 5.5×10^5 UFC, de la cepa 16M

de *B. melitensis*. Los animales eran vigilados dos veces al día por personal del INIFAP y por un MVZ para detectar cualquier problema reproductivo o de salud en general. Una vez que se presentara el aborto o el parto, las cabras y los cabritos fueron sacrificados conforme a Norma Oficial Mexicana NOM -033-SAG/ZOO-2014-Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres, con una pistola de embolo oculto (Jarvis®). Con la finalidad de tomar muestras de órganos tanto de la madre como de los cabritos.

5.2. Toma de muestras

Muestras de sangre

Las muestras de sangre para obtención de suero de todos los animales, se realizó por punción de la vena yugular de manera aséptica, antes de iniciar el experimento para confirmar que los animales fueran seronegativos a la prueba de tarjeta al 3%, posteriormente se tomaron muestras de suero los días 0, 7, 14, 17, 21, 28 y 90 con respecto a la vacunación, de todos los animales (n=52). Después del desafío se tomaron muestras los días 14, 21, 28, 35,42, 49 y el día del sacrificio (n=40). Estas muestras se usaron para realizar la prueba de tarjeta al 3%. Además, se seleccionaron siete animales de cada grupo, a los cuales se les tomó muestras de sangre completa (50mL), para la extracción de PBMC con anticoagulante ACD, las células extraídas a partir de estas muestras fueron usadas para medir la producción de IFN- γ en cultivos *in vitro* después de haber sido estimuladas y para cuantificar la producción de citocinas a partir de muestras de RNA.

Muestras de órganos

Una vez que se presentó el parto o el aborto, las cabras fueron sacrificadas junto con los cabritos de manera humanitaria; mediante insensibilización con una pistola de embolo oculto y posterior degüelle en las instalaciones de contención en las que permanecían. En la necropsia de los fetos abortados o de los cabritos que nacieron aparentemente sanos se tomaron muestras de bazo, hígado, pulmón y líquido abomasal. Mientras que en la necropsia de las cabras se obtuvieron

muestras de hígado, bazo, útero y/o cotiledones, leche, médula ósea, hisopo vaginal, así como de los linfonodos submandibulares, retrofaríngeos, parotídeos, preescapulares, mediastínicos, inguinales y supramamarios.

5.3. Prueba de tarjeta al 3%

Las muestras de suero fueron probadas para observar la presencia de anticuerpos usando el aba test tarjeta al 3% (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 30µL del antígeno en suspensión y una cantidad igual de suero, que se mezclaron y se leyeron a los cuatro minutos, la reacción de aglutinación se consideró como una prueba positiva, mientras que la ausencia de esta reacción se consideró como una prueba negativa.

5.4. Análisis bacteriológico

Las muestras de órganos fueron flameadas en la parte externa, para evitar la contaminación, posteriormente fueron macerados con PBS estéril y se sembraron en medio TSA con suplemento de Farrel. La leche y el hisopo vaginal fueron tomadas lo más asépticamente posible y se sembraron directamente en medio Farrel. Subsiguientemente todos los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante cuatro a cinco días, a los cultivos sugerentes a *B. melitensis* se les realizó una PCR para confirmar que se trata de esta bacteria.

5.5. Extracción de células mononucleares de sangre periférica

De los 50mL de sangre que se obtuvieron de la vena yugular con el anticoagulante ACD (6 ml) (Citrato trisódico 22g + ácido cítrico 8g+ dextrosa 24.5g+ agua destilada cbp 1000 mL), se extrajeron las células mononucleares por gradiente de Ficoll (Histopaque®-1077. Sigma-Aldrich®). Del número total de células mononucleares, un aproximado de cinco millones de células fueron usadas para determinar la diferencia en la transcripción de citocinas, características de una respuesta inmune celular o humoral por medio de qPCR: IL-12, IL-2, TNF-α e INF-γ y adicionalmente IL-5, IL-10 e IL-4.

5.6. Cuantificación de INF- γ (Prueba de Bovigam®)

Para medir la producción de interferón gama se usó la prueba comercial Bovigam® de laboratorio Thermo Fisher Scientific. Es un ELISA de tipo sándwich, la cual está diseñada para la detección de Tuberculosis bovina, sin embargo, adaptamos la prueba para medir la producción de IFN- γ a partir de PBMC de cabra estimulados con proteínas de *Brucella* spp (Brucelina) elaborado en nuestro laboratorio, a razón de 5.4 μ g de proteína por pozo igual que en la prueba con tuberculina.

Etapa 1: Cultivo de sangre completa

- Para esta prueba se tomó sangre en tubos Vacutainer® con heparina, las cuales fueron procesadas dentro de las seis horas posteriores a haber sido tomadas.
- Se agregaron 200 μ l de sangre heparinizada en cada pozo de placas de cultivo celular.
- A cada muestra se le dieron tres estímulos diferentes: PBS (control negativo), concanavalina (control positivo) y 45 μ l de “Brucelina” a una concentración de 0.096 μ g/ μ l (De acuerdo con el procedimiento de la prueba de Bovigam®, en la cual se agregan 18 μ l de tuberculina que está a una concentración de 3 μ g/ml de proteína bacteriana).
- Las placas se homogenizaron en un agitador orbital durante cinco minutos.
- Posteriormente se incubaron a 37°C en una estufa de cultivo celular con 5% de CO₂ durante 18-24 h.
- Después de haber sido incubadas, las placas se centrifugaron a 70 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y se colectó todo el plasma sobrenadante y permaneció a -20°C hasta su uso.

Etapa 2: inmunoensayo enzimático IFN- γ bovino (ELISA). Se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (apéndice 1)

5.7. Extracción de RNA total a partir de PBMC

El RNA total fue extraído a partir de las muestras de sangre obtenidas de la vena yugular, a los días 0, 15, 19 y 80 por medio del método de extracción fenólica con TRIZOL (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies). Este método separa la muestra en dos fases por medio de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina; las células se lisan y posteriormente se separa la muestra en dos fases: acuosa y orgánica. A los 5 millones PBMC se les colocaron 400 µL de Trizol y 200 µL de cloroformo en microtubos de 1.5 mL, las mezclas se incubaron en hielo por 5 minutos y se agitaron en vórtex.

La mezcla homogenizada se centrifugó a 2100 g por 15 min a 4°C; en este paso se eliminan los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y se adicionaron 500 µL de isopropanol frío, el cual precipita el RNA, esta mezcla se incubó por 24 h a -20 °C. Posteriormente la muestra se centrifugó a 2100 g por 10 min a 4°C, se decantó y la pastilla se lavó con etanol al 75% frío, y se centrifugó por 5 minutos a 630 g a 4°C. En el último lavado, el etanol se eliminó y la pastilla se secó por aproximadamente 6 h. Al final, la pastilla de RNA se resuspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas. Después de procedió a cuantificar y determinar la integridad del RNA total en un Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop®).

5.8. Síntesis de cDNA (RT)

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total obtenido anteriormente por medio de la transcripción inversa, se emplearon iniciadores al azar Random Primers y las moléculas de mRNA funcionan como molde, se requiere la presencia de dNTP's y la transcriptasa inversa. El proceso se realizó en dos fases:

En la primera se colocaron 0.8 µL de random primers (0.5 µg/ µL) (Invitrogen®) y 0.8 µL de dNTPs (10mM) (Invitrogen®) en 10 µL (200 ng) de RNA, esta mezcla se incubó a 65 °C por 5 minutos y después se transfirió a hielo, en el segundo paso se agregó una mezcla que contiene 4 µL de buffer 5X, 2 µL de DTT, 0.5 µL de RNAsa OUT Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen®), 0.25 µL de transcriptasa

inversa (Super Scrip® III- Invitrogen) y 1 μ L de agua, para continuar con el siguiente protocolo: 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min y 70 °C por 15 min.

El cDNA se cuantificó en un Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop®) y se guardó a -20 °C para su posterior uso.

5.9. Cuantificación de la expresión de citocinas mediante la PCR

Para la medición de la expresión de citocinas de la respuesta TH1 y TH2 se utilizó el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta$ Ct), el cual consiste en comparar el Ct (threshold cycle) de la muestra desconocida, con una muestra de calibración como referencia fisiológica (gen endógeno). Todas las cuantificaciones fueron normalizadas con Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno.

Para la qPCR, se preparó una mezcla de reacción que contenía: 12.5 μ L de PCR Master Mix (Promega, USA), 0.25 μ L (1 μ M) de cada uno de los iniciadores (Tabla 1), 0.2 μ L de EvaGreen® (Biotin) y 11 μ L de agua libre de nucleasas. En esta mezcla se adicionó 1 μ L de cDNA (0.1 μ g/mL) de cada una de las muestras, cada reacción se realizó por duplicado.

Se estandarizó el protocolo de la qPCR llevando a cabo el siguiente: una desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg y 72 °C por 30 min seguido de una extensión final de 72 °C, se realizaron las curvas MELT en el Termociclador LighCycler 480 (Roche), se tomaron en cuenta los valores de Ct y la cuantificación se hizo por la técnica de $\Delta\Delta$ Ct normalizando con el gen GAPDH.

Tabla 1: Iniciadores para las citocinas
--

Iniciador	Secuencia	Gen amplificado	Referencia
IL-12P40f	AACCTGCAACTGAGACCACT	IL-12	Esteves <i>et al.</i> , 2008
IL-12p40r	ATCCTTGTGGCATGTGACTT		
IL-2f	GCTCCAAGCAAAAACCTGAA	IL-2	Ehsan <i>et al.</i> , 2008
IL-2r	CAGCCTTTACTGTGCGCATCA		
TNFaf	GAATACCTGGACTATGCTGA	TNF	Smeed <i>et al.</i> , 2007
TNFar	CCTCACTTCCCTACATCCCT		
IFN _g f	TTCCGGTGGATGATCTGC	INF	Esteves <i>et al.</i> , 2008
IFN _g r	GAGAACCATTACATTGATGCTC		
IL-4f	GTACCAGCCACTTCGTC CAT	IL-4	Ehsan <i>et al.</i> , 2008
IL-4r	TCTGCGATGTGAGGATGTTC		
IL-10f	TTTCAAATGAAGGACCAACTG	IL-10	Esteves <i>et al.</i> , 2008
IL-10r	GAGTTCACGTGCTCCTTGAT		
IL-5f	CCTACTCCTCAGCATACAAATCACC	IL-5	Este estudio
IL-5r	ACAGCATCCCCTTGTGCAGT		
GAPDHf	GGCGCCAAGAGGGTCAT	GAPDH	Dhanasekaran <i>et al.</i> , 2013
GAPD Hr	G TTCACGCCCATCACAAACAT		

6. RESULTADOS

El experimento se llevó a cabo en varias fases: postvacunación, inseminación, desafío, sacrificio y la fase *in vitro*.

Resultados a la prueba de tarjeta al 3% postvacunación.

Todas las cabras utilizadas en este estudio (n=52) fueron seronegativas a la prueba de tarjeta al 3% cuando los animales fueron adquiridos y el resultado fue el mismo cuando inició el experimento (Día 0). Tres de los cuatro grupos (PBS, inmunógeno y adyuvante) se mantuvieron seronegativos en la prueba de tarjeta al 3% después de haber sido inoculadas con su tratamiento correspondiente. En el grupo restante (Rev-1) a partir del día 7 postvacunación, siete animales resultaron

seropositivos en la prueba de tarjeta al 3%, y en las muestras posteriores el número de animales seropositivos aumento a 10 animales, sin embargo, al día 90 post vacunación todos los animales resultaron seronegativos a la prueba de tarjeta al 3% (Tabla 2).

Tabla 2. Número de animales positivos a la prueba de tarjeta al 3% a diferentes días posteriores a la vacunación						
Grupo	Día 0 PV	Día 7 PV	Día 14 PV	Día 21 PV	Día 28 PV	Día 90 PV
r-Btub, Hia, Flgk (Inmunógeno)	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
Adyuvante	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
PBS (control negativo)	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
Rev-1 (control positivo)	0/14	7/14	10/14	10/14	3/14	0/14

Resultados de la inseminación

A los cinco meses después del inicio del proyecto, los animales se inseminaron, 30 días después se realizó el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía transrectal, los resultados de gestación fueron muy satisfactorios, de los 52 animales iniciales, 41 (78.85%) de ellos resultaron positivos a la gestación, sin embargo no en todos los grupos se logró alcanzar los diez animales gestantes, por lo tanto se seleccionaron diez animales para la fase de desafío, los criterios de inclusión fueron que estuvieran gestantes y hayan sido de los animales que se extraían células mononucleares de sangre periférica, en la Tabla 3 se muestra el número de animales gestantes por cada uno de los grupos. A los 90 días de gestación (150 días post-vacunación) las cabras fueron desafiadas (n=41) con la cepa 16M de *B. melitensis*, 14 días después del desafío solo un animal fue seropositivo y el número de animales positivos a la prueba de tarjeta al 3% se incrementó en los muestreos subsecuentes (Tabla 4).

Tabla 3. Numero de cabras gestantes y de cabritos nacidos por grupo

Grupo	Número de cabras gestantes antes del desafío	Número de cabras gestantes que entraron al desafío	Número de gestaciones múltiples	Número de cabritos
r-Btub, Hia, Flgk (Inmunógeno)	8/12	8/10	5	13
Adyuvante	7/12	7/10	5	13
PBS (control negativo)	13/14	10/10	6	18
Rev -1 (control positivo)	12/14	11/11	7	20

Resultados a la prueba de tarjeta al 3% postdesafío

Una vez que un animal abortaba o paría era eutanasiado, por lo que conforme el proyecto avanzaba el número de animales iba disminuyendo en cada grupo. En ningún grupo hubo el 100% de animales seropositivos tras haber sido desafiados, en el grupo del inmunógeno, un total de siete de los 10 animales (70%) fueron positivos a la prueba de tarjeta, mientras que en los grupos del adyuvante y el grupo PBS (control negativo) solo cinco de 10 animales (50%) de cada grupo fueron seropositivos a la prueba de tarjeta al 3%, y en el grupo de la vacuna oficial Rev -1 (control positivo) un solo animal de once dio esta misma respuesta (Tabla 4).

Tabla 4. Número de cabras positivas a la prueba de tarjeta al 3%, a diferentes días posteriores al desafío experimental.						
Grupo	14 DPD	21 DPD	28 DPD	35 DPD	42 DPD	49 DPD
r-Btub, Hia, Flgk (Inmunógeno)	1/10	2/10	2/10	3/9	4/9	6/9
Adyuvante	0/10	3/10	4/10	3/9	3/8	3/8
PBS (control negativo)	0/10	2/10	3/9	3/8	4/8	3/7
Rev-1 (control positivo)	0/11	0/11	0/11	1/11	1/11	1/10

Manifestación clínica y aislamiento de *B. melitensis* a partir de órganos y tejidos

En todos los grupos hubo animales que presentaron aborto o el nacimiento de crías débiles. Sin embargo, en el grupo Rev-1 fue en el cual se presentaron menos de estos eventos y por lo tanto un mayor número de cabritos sanos (Tabla 5).

A partir de diferentes muestras de órganos provenientes tanto de la madre, como de los cabritos, en todos los grupos se logró el aislamiento de la cepa virulenta *B. melitensis* 16M de al menos una muestra. De las madres se tomaron 16 muestras de órganos o secreciones, mientras que de los cabritos se tomaron 4 muestras de cada uno. Es importante destacar que del grupo Rev -1 logramos aislar *B. melitensis* de diez muestras de hígado de los cabritos de las veinte que había, esto incluso en cabritos que llegaron a término de la gestación y eran aparentemente sanos. En el resto de las muestras el número de aislamientos fue similar al de los demás grupos (Tabla 7).

Tabla 5. Número de nacimientos y de abortos por grupo

	Gestaciones múltiples	Número de cabritos	Cabritos sanos	Abortos o mortinatos (productos)	Número de hembras que abortaron
r-Btub, Hia, Flgk (Inmunógeno)	5/8	13	6/13 (46.2%)	7/13 (53.8%)	5/8 (62.5%)
Adyuvante	5/7	13	6/13 (46.2%)	7/13 (53.8%)	4/7 (57.14%)
PBS (control negativo)	6/10	18	9/18 (50%)	9/18 (50%)	5/10 (50%)
Rev -1 (control positivo)	7/11	20	16/20 (80%)	4/20 (20%)	3/11 (27.2%)

Por otro lado, en las muestras provenientes de las madres logramos también el aislamiento de *B. melitensis* en todos los grupos, en el grupo control positivo se logró el aislamiento de *B. melitensis* a partir de los órganos de cinco cabras. Los órganos a partir de los cuales se obtuvieron más aislamientos fueron los nódulos linfáticos supramamarios, nódulos mesentéricos, el hígado y el bazo. Se destaca

que, en las muestras obtenidas de los cabritos también se logró el aislamiento de la bacteria en todos los grupos (Tablas 6 y 8).

Tabla 6. Número de cabras positivas al aislamiento de *B. melitensis* en al menos un órgano o tejido

Grupo r-Btub, Hia, Flgk	Grupo adyuvante	Grupo PBS (control negativo)	Grupo Rev -1 (control positivo)
7/10 (70%)	7/10 (70%)	9/10 (90%)	5/11 (45.45%)

Tabla 7. Resultados de aislamiento de *B. melitensis* en las muestras obtenidas al sacrificio de los cabritos

	r-Btub, Hia, Flgk	Adyuvante	PBS (control negativo)	Rev -1 (control positivo)
Número de animales positivos	8/13 (61.54%)	9/13 (69.23%)	9/19 (47.36%)	10/20 (50%)
Muestra				
Hígado	6	7	6	10
Bazo	7	7	7	7
Pulmón	7	7	7	7
Líquido abomasal	2	6	2	2

En la Tabla 9 se resumen los resultados de las manifestaciones clínicas que tuvieron cada uno de los grupos tras haber sido desafiados, se resalta que en el grupo Rev -1, ocho de las once hembras parieron cabritos aparentemente sanos y solo hubo tres abortos; sin embargo, se logró el aislamiento de *B. melitensis* de la mitad de los cabritos (x=10).

Tabla 8. Aislamiento de *B. melitensis* en las muestras obtenidas al sacrificio de las cabras.

Órgano	Grupo r-Btub, Hia, Flgk (n=10)	Grupo adyuvante (n=10)	Grupo PBS (control negativo) (n=10)	Grupo Rev-1 (control positivo) (n=11)
Nódulo linfático submandibular	5	4	4	1

izquierdo				
Nódulo linfático parotídeo derecho	2	2	6	0
Nódulo linfático parotídeo izquierdo	3	4	3	1
Nódulo linfático preescapular derecho	5	5	5	1
Nódulo linfático preescapular izquierdo	4	4	2	1
Nódulo linfático retrofaríngeo derecho	4	3	3	1
Nódulo linfático retrofaríngeo izquierdo	7	5	3	1
Nódulo linfático supramamario derecho	5	6	6	3
Nódulo linfático supramamario izquierdo	4	5	6	2
Nódulo linfático mesentérico	5	5	4	3
Nódulo linfático inguinal derecho	5	2	3	0
Nódulo linfático inguinal izquierdo	6	3	3	2
Hígado	7	4	6	3
Bazo	7	6	5	3
Útero	4	6	5	2
Medula ósea	0	1	4	0
Leche	2	4	4	4

(I): Grupo Inmunógeno

(+): Aislamiento positivo

(A): Grupo Adyuvante

(-): Aislamiento negativo

(P): Grupo PBS, control negativo

(C): contaminado

(R): Grupo Rev-1 control positivo

(X): sin muestra

(na): no aplica, hembras no gestantes

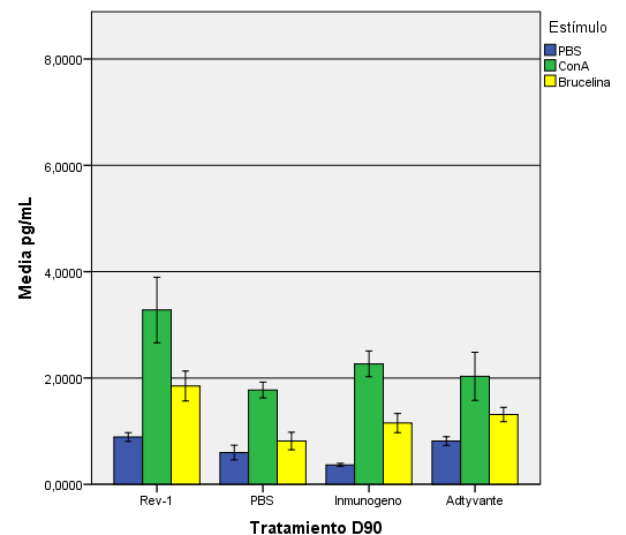
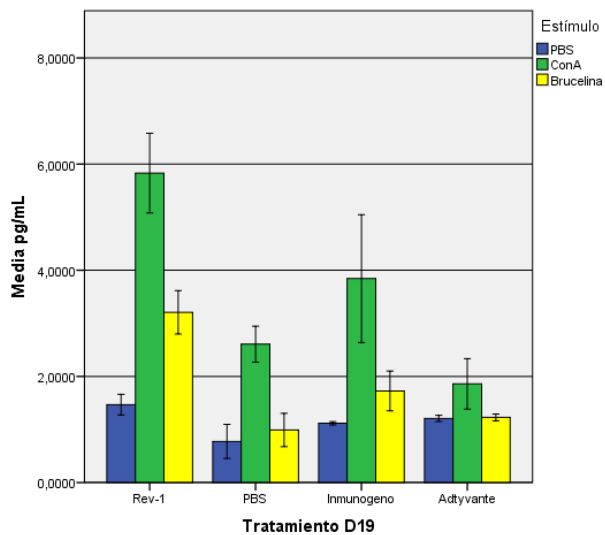
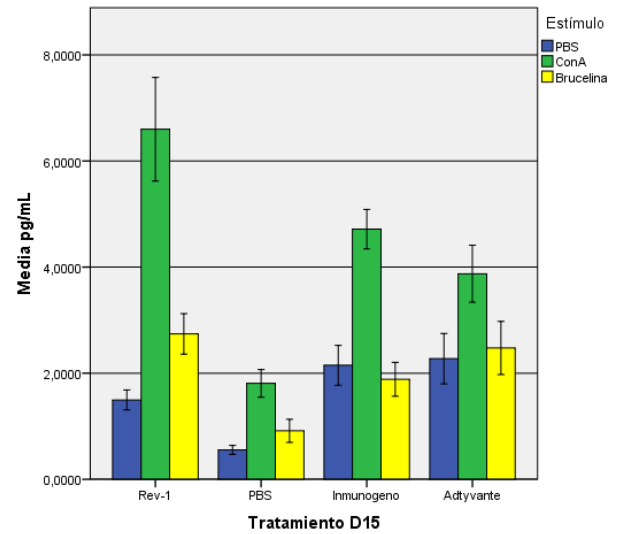
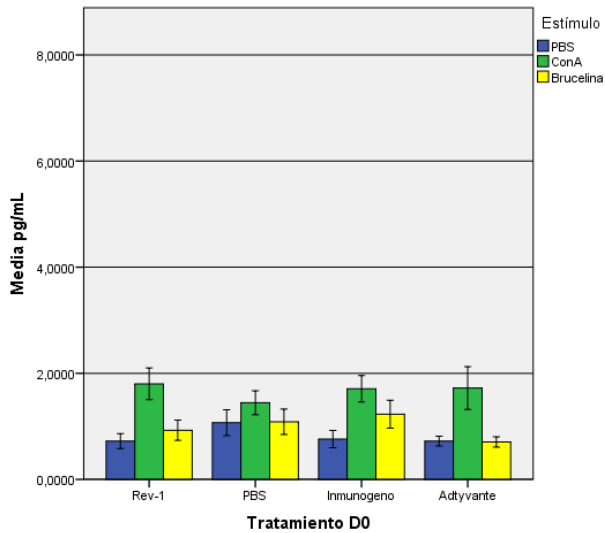
Tabla 9: Número de partos, abortos y aislamiento de *B. melitensis*, por cada grupo de cabras

Grupo	No. Animales desafiados	Nacimiento viable	Abortos	Animales no gestantes	Número de productos	Aislamientos en cabras	Aislamientos en cabritos
r-Btub, Hia, Flgk (Inmunógeno)	10	3	5	2	14	8/10 80%	10/14 71%
Adyuvante	10	3	4	3	13	7/10 70%	9/13 69%
PBS (control negativo)	10	6	4	0	19	9/10 90%	9/19 47%
Rev-1 (control positivo)	11	8	3	0	20	5/11 45%	10/20 50%

Resultados *in vitro*

Producción de INF- y a partir de cultivo celular *in vitro*

De las muestras de sangre heparinizada se realizó la prueba de Bovigam® para medir la producción de INF- γ , y se observó que no existe una tendencia en particular en la producción de esta citocina en los diferentes tratamientos *in vivo*;



sin embargo, cuando se estimuló *in vitro*, el tratamiento con concanavalina fue el que más estimuló la producción de INF- γ , hasta tres veces más, por lo que la vacuna recombinante junto con el adyuvante no induce una fuerte respuesta inmunológica innata y por lo tanto no se producen grandes cantidades de INF- γ ya que el mitógeno inespecífico produce cantidades mayores de INF- γ .

Fig. 5. La vacunación con el inmunógeno y Rev-1 inducen la producción de INF- γ . Media de producción de INF- γ a partir de sangre obtenida de cabras de los diferentes grupos en los días 0 (A), 15(B), 19 (C) y 80(D) postvacunación y estimuladas con PBS (control negativo), ConA (control positivo) y Brucelina. El sobrenadante fue colectado después de 24 h de incubación y la producción de INF- γ fue determinada por ELISA. Los resultados se expresan como la media de DS de experimentos por triplicado. $p < 0.5$.

6.2.1. Perfil de citocinas

Los niveles de citocinas se midieron a través de qRT-PCR; medimos citocinas de perfil Th-1 las cuales tiene una mayor producción en los PBMC provenientes de animales del grupo Rev -1, esto sucede al menos en tres citocinas: el IFN- γ , TNF- α y la IL-2, la mayor diferencia entre los grupos se ve en el día 19 post vacunación. Mientras que al día 80 la producción de estas citocinas disminuye a niveles similares al basal (día 0), mientras que en la IL-12 no se aprecian diferencias significativas en ninguno de los grupos ni en ninguno de los diferentes días en los que se realizó la medición.

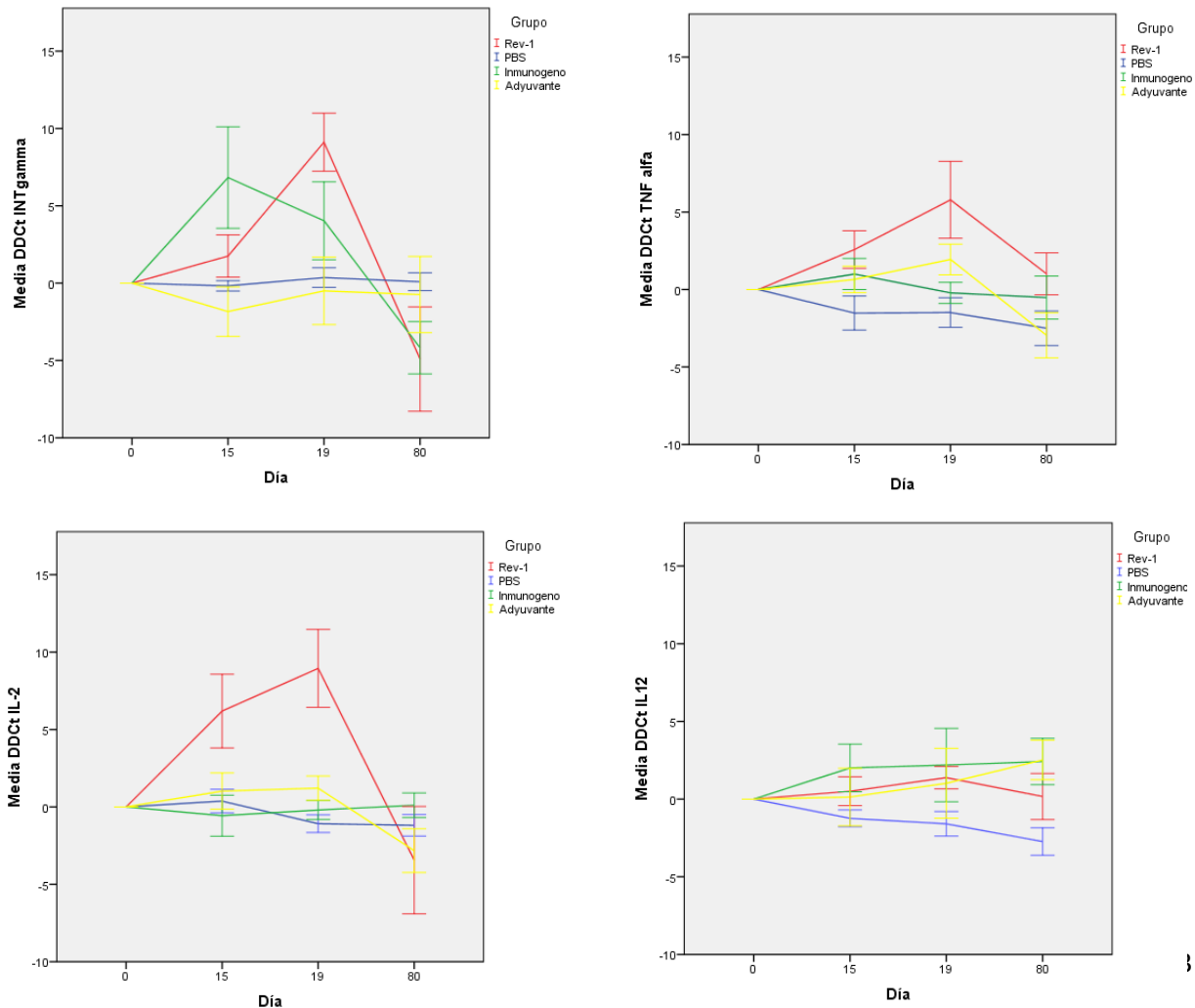


Fig. 6 El inmunógeno estimula la producción de IFN- γ , pero no de otras citocinas Th-1 en PBMC extraídos de cabras en diferentes días postvacunación. Los PBMC fueron extraídos de cabras a partir de los días 0, 15, 19 y 80 postvacunación de los diferentes grupos de cabras: Rev -1, PBS, inmunógeno y adyuvante, se extrajo el RNA a partir de 5 millones de PBMC y se realizó rt-qPCR para medir los transcritos de RNA de INF- γ (A), TNF- α (B), IL-2 (C) e IL-12 (D) Los niveles de citocinas fueron analizados por PCR cuantitativo. Los resultados se expresan como la media de DS de dos experimentos diferentes $p < 0.05$.

Del otro lado, en las citocinas del perfil Th-2 el comportamiento fue contrario al de las citocinas anteriores, ya que el grupo Rev-1 tuvo una regulación negativa de citocinas como la IL-5, la IL-10 y solo la IL-4 tuvo un alza al día 80 postvacunación. Mientras que, en los PBMC de animales del grupo adyuvante, mostraron una regulación positiva de las citocinas IL-4 e IL-5 en el día 15 y 19 postvacunación y de la IL-10 solo en el día 19 post-vacunación.

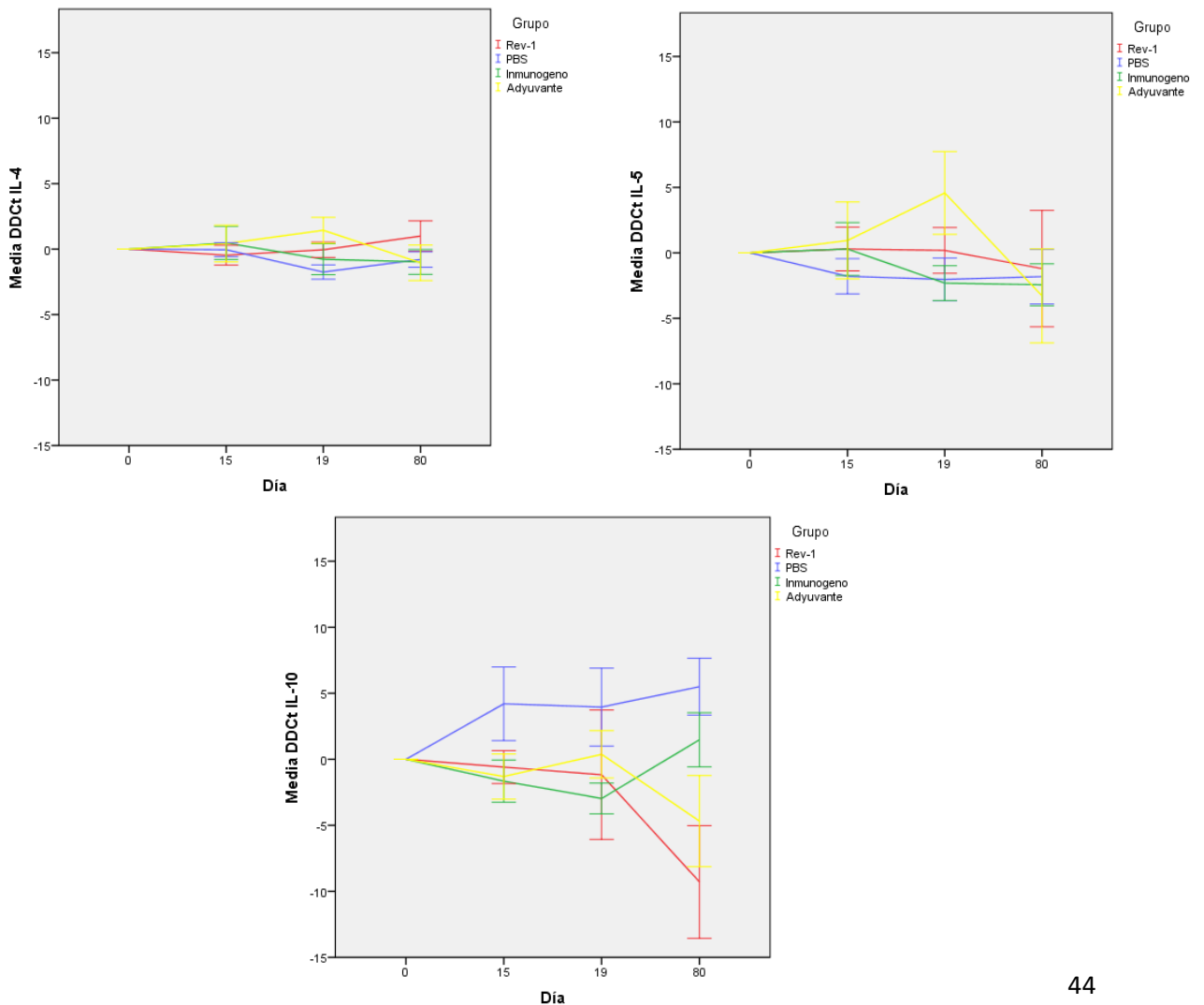


Fig. 7 El inmunógeno no estimula la producción de citocinas del perfil Th-2. Los PBMC fueron extraídos de cabras a partir de los días 0, 15, 19 y 80 postvacunación de los diferentes grupos de cabras: Rev -1, PBS, inmunógeno y adyuvante, se extrajo el RNA a partir de 5 millones de PBMC y se realizó rt-qPCR para medir los transcritos de RNA de IL-4 (A), IL-5 (B), e IL-10 (C). Los niveles de citocinas fueron analizados por PCR cuantitativo. Los resultados se expresan como la media de DS de dos experimentos diferentes $p < 0.05$.

7. DISCUSIÓN

La vacunación es probablemente una de las formas más viables de prevenir la brucelosis en los animales y por lo tanto también de disminuir los casos que se presentan en el ser humano, debido a que es un método accesible, rápido y que en general provee una buena respuesta inmune; sin embargo, continúan las investigaciones para generar vacunas que sean más seguras que la vacuna aprobada actualmente para la prevención de la enfermedad en las cabras (Rev-1). Las nuevas tecnologías ofrecen la posibilidad de identificar antígenos de los patógenos que tengan un mayor potencial para inducir una respuesta inmune protectora, junto con las tecnologías aplicadas a los nuevos adyuvantes que sean capaces de imitar los patrones de patogénesis (POP por sus siglas en inglés), que se definen como una combinación de señales que incluyen la producción de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a daños (DAMP) en condiciones de infección específicas, los cuales sean capaces de seleccionar mecanismos inmunes específicos para crear vacunas más seguras (Vitry MA *et al.*, 2012). En estudios previos se evaluó una vacuna recombinante contra la brucelosis en un modelo murino; los resultados demostraron que los antígenos recombinantes junto con el adyuvante de aluminio-silicato indujeron una respuesta inmune con un perfil Th-1 en estos animales, sin embargo, en ese trabajo no se hicieron experimentos de desafío para medir la protección que ese inmunógeno era capaz de generar a largo plazo (Gomez *et al.*, 2013). Por lo tanto, en el presente estudio se probó esta misma vacuna en el hospedero preferencial de *B. melitensis*, para elucidar si el inmunógeno era capaz de inducir una respuesta similar a la generada en el modelo de ratón; además de

que en nuestro experimento también desafiamos a las cabras gestantes, para poder ver si la vacuna también evitaba las manifestaciones clínicas de la brucelosis.

En el experimento anterior que se realizó en el modelo de ratón se observó que este nuevo inmunógeno hecho de proteínas recombinantes de *B melitensis* genera una respuesta inmune celular específica, pero no produce anticuerpos detectables por las pruebas convencionales que se utilizan actualmente para el diagnóstico de la brucelosis; en nuestro trabajo obtuvimos el mismo resultado ya que los animales a los que se les aplicó este inmunógeno no tuvieron una respuesta inmune humoral detectable con la prueba de tarjeta al 3%, lo cual es una ventaja si en un futuro este inmunógeno es apto para ser usado en el modelo de cabra, ya que no hay reacciones cruzadas con las pruebas oficiales, cualidad de la cual carece la vacuna viva que actualmente se usa para la inmunización de estos animales y es deseable para el desarrollo de nuevas vacunas (Cassataro *et al.*, 2007).

En la parte reproductiva tuvimos una buena tasa de gestación (78% en promedio); en general estos resultados ayudan en la investigación para medir la eficacia de una vacuna contra la brucelosis, ya que esta enfermedad se caracteriza por producir problemas reproductivos, además de que los pequeños rumiantes son el hospedero predilecto de *B. melitensis*, por lo cual es imperioso que una vacuna dirigida hacia esta especie sea capaz de protegerla y evitar las manifestaciones clínicas así como la diseminación de la enfermedad. Asimismo, el sistema caprino tiene ventajas en ser usado en este tipo de experimentos debido al tiempo, manejo, espacio necesario y costos en comparación con otras especies pecuarias que son afectadas por este patógeno (Elzer *et al.*, 2002).

En el grupo del inmunógeno hubo un 70% de los animales que tuvo una respuesta serológica detectable a la prueba de tarjeta al 3% después de haber sido desafiados, en los grupos del adyuvante y el control negativo (PBS) hubo 50% de animales que fueron positivos a esta misma prueba, lo que indica que los animales se infectaron con la cepa de desafío, lo cual se corroboró con el aislamiento de la bacteria a partir de los órganos de las madres. Sin embargo, no todos los animales

infectados resultaron positivos a la prueba de tarjeta; en otros trabajos se reportó un máximo de 55% de animales gestantes positivos a la prueba de tarjeta al 3% después del desafío (Higgins et al., 2017). Es de destacar, después de que once animales de los catorce iniciales que integraban el grupo Rev-1 fueron positivos a la prueba de tarjeta al 3% tras la vacunación, solo un animal (animal No. 271) de los diez que fueron desafiados, fue positivo a la misma prueba; cabe señalar que este animal fue uno de los tres animales que abortó en ese grupo, además que en este estado fisiológico (gestación), la respuesta inmunológica de la madre en el útero tiene una predominancia hacia Th-2 necesaria para la tolerancia inmunológica a los fetos (Littauer y Skountzou, 2018), pero no lo suficiente como para evitar la diseminación de *B. melitensis* hacia el producto, ya que de los productos provenientes de esta cabra se logró el aislamiento de *B. melitensis*, lo que pudo haber llevado al aborto. En el resto de los animales que no tuvieron anticuerpos detectables, esto pudo deberse a su estado fisiológico; al igual que en otros trabajos en bovinos se describió el retraso en la seroconversión hasta después de que ocurría el aborto en animales infectados con *B. abortus* (Samartino y Enright, 1993). Las hormonas sexuales juegan un papel crucial en la organización de las poblaciones celulares pertenecientes al sistema inmune, lo que es esencial para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Además, se ha establecido que algunas hormonas como la progesterona (una de las principales hormonas en el mantenimiento de la gestación) son un regulador negativo en la linfopoyesis de células B, que a su vez ayuda a la tolerancia del feto, evitando el reconocimiento por parte de los anticuerpos y a su vez hay una producción menor de anticuerpos contra enfermedades infecciosas (Littauer y Skountzou, 2018). Por el contrario, hubo animales de los grupos del adyuvante y el grupo PBS que dieron respuestas positivas a la prueba de tarjeta al 3% y de las cuales no logramos el aislamiento de la bacteria o se logró solo de algunos nódulos linfáticos regionales a la zona de inoculación, lo cual indica que hay animales que tienen una resistencia natural a la infección. En otro trabajo se observó que la respuesta inmunológica mediada por células en cabras es altamente variable (Higgins et al., 2018), sobre todo porque son poblaciones

genéticamente abiertas, y que no están libres de patógenos específicos, por lo cual la infección concurrente con otros patógenos puede afectar la respuesta hacia *Brucella* spp.

A pesar de que el grupo Rev-1 fue el que mostró una menor cantidad de abortos y a su vez tuvo una mayor cantidad de animales nacidos vivos, también fue del que logramos más aislamientos a partir del hígado de los productos. Sin embargo, en términos generales el porcentaje de aislamientos a partir de cabritos fue menor ($10/20=50\%$) que en el grupo del inmunógeno y del adyuvante, en los cuales logramos el aislamiento de 8 de los 13 cabritos (61.5%) de cada uno de los grupos. Cabe mencionar que los aislamientos bacterianos de los fetos abortados de los grupos: inmunógeno, adyuvante y PBS pudieron haber sido mayores pues varias muestras resultaron contaminadas debido a que muchos animales abortaban durante la noche y los productos estuvieron expuestos al medio antes de la revisión diaria matutina. Por otro lado, esto no pasaba en el grupo Rev-1 ya que la mayoría de los productos nacieron viables y la contaminación de las muestras no sucedía. Se sabe que los órganos blanco de *B. melitensis* son aquellos que pertenecen al sistema retículo endotelial, así como el útero grávido (Martirosyan *et al.*, 2011. Figueiredo *et al.*, 2015), lo que se refleja también en este trabajo, ya que fue de estos mismos órganos de los cuales logramos más aislamientos.

El adyuvante que demostró ser seguro e inducir un perfil de citocinas Th-1 en el modelo murino, en el modelo caprino está lejos de inducir el mismo perfil de citocinas, puesto que en los PBMC extraídos del grupo al cual solo se le aplicó el adyuvante, se vio favorecida la producción de citocinas como IL-4 e IL-5, mientras que en el grupo del inmunógeno con el adyuvante, de las citocinas del perfil Th-1 solo el IFN- γ tuvo una regulación positiva significativa en los días 15 y 19 postvacunación, el resto de las citocinas Th-1 tuvieron valores menores y ninguna de estas citocinas tuvo mayor producción que en las PBMC del grupo Rev-1. En otros trabajo se ha visto que un mismo adyuvante puede tener diferentes efectos en diferentes especies, por ejemplo algunos agonistas de TLR-3 inducen toxicidad

en el modelo murino, pero demostraron ser seguros en primates no humanos (Gutjahr *et al.*, 2016). Otro trabajo demostró que un mismo adyuvante puede inducir diferentes respuestas inmunes innatas en grupos de edades diferentes, ya que una vacuna del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B adsorbido en hidróxido de aluminio desencadenó una respuesta innata muy débil en humanos jóvenes y como consecuencia tuvo una pobre respuesta de anticuerpos y células T, mientras que en animales hubo una fuerte respuesta inmune innata (Burny *et al.*, 2017).

Las razones por las cuales el inmunógeno pudo no ser suficiente para proteger a las cabras contra el desafío son múltiples; por ejemplo, en un estudio se demostró que cuando se trata de antígenos recombinantes una sola aplicación o incluso dos no son lo suficientemente efectivas para prevenir la colonización de los órganos blancos de *B. melitensis* en el modelo de ratón, aun cuando se usan adyuvante como los liposomas, que si bien mejoran la respuesta a diferencia del antígeno solo, no es suficiente para una protección; en ese estudio manejaron hasta cuatro revacunaciones para lograr niveles de citocinas comparables a las que induce la vacuna Rev-1 (Commander *et al.*, 2010), lo que quizá en el modelo de cabra no sea práctico ni costeable, pero es a la vez el mejor modelo para este inmunógeno y en el cual se debe probar su utilidad. Al mismo tiempo, el mecanismo de acción del adyuvante no está definido, por lo que es un tanto empírico y es necesario definir si la respuesta que se obtuvo tiene bases genéticas que pudieran explicar la diferencia que se obtuvo entre estas dos especies.

Los resultados del presente estudio demuestran que el inmunógeno constituido por las proteínas Btub, Hia y FlgK, no fue capaz de otorgar protección a las cabras de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y tampoco evitó la colonización de los órganos linfoides primarios y secundarios ni del aparato genital después de haber sido desafiadas con la cepa virulenta *B. melitensis* 16M. Varios estudios demuestran que la respuesta desarrollada hacia un mismo patógeno o un antígeno varían cuando se administran a diferentes especies, e incluso a diferentes cepas. Por ejemplo, se sabe que las cepas BALB/c y C57BL/6 de

ratones muestran diferentes niveles de resistencia a la infección por *B. melitensis* (Curina *et al.*, 2018; Vitry *et al.*, 2014).

Recientemente se demostró que los anticuerpos son necesarios para controlar la diseminación de la bacteria a través de la sangre, sin embargo, el control tardío de la infección requiere la participación de anticuerpos específicos contra *Brucella* spp y células T CD4⁺ Th1 productoras de IFN- γ , ya que la ausencia de alguno de estos dos elementos conduce a la persistencia de la bacteria en el bazo. En este mismo estudio quedó demostrado que el desarrollo de células T CD4⁺ Th1 productoras de IFN- γ depende de las vías de señalización MyD88/IL-12p35, por lo que se sugiere que algunos adyuvantes que usen antígenos recombinantes sean capaces de estimular estas vías para lograr una mayor producción de células productoras de IFN- γ y a su vez estimulen la producción de anticuerpos del isotipo IgG2a (Vitry *et al.*, 2014). Varios autores han demostrado que los linfocitos T CD8⁺ son cruciales para el control de la brucelosis, no solo por su efecto citotóxico sino también porque son productoras de IFN- γ , de hecho Durward *et al.* identificaron dos epítopes de *B. melitensis* que son capaces de estimular la producción de IFN- γ y la muerte específica de células infectadas *in vitro* mediada por linfocitos T CD8⁺, lo cual resalta la importancia de estas células y a la vez es importante que los inmunógenos dirigidos para la prevención de la brucelosis sean capaces de estimular estas células y que también sean probados en modelos de cabra para comprobar su efectividad *in vivo*.

A pesar de que el inmunógeno induce una respuesta de citocinas con desviación hacia Th-1, esta estuvo por debajo de la que induce la vacuna Rev-1 y específicamente la IL-2 que es un factor de crecimiento de los linfocitos, indispensable para el establecimiento de una memoria inmune celular. En un estudio con ratones knockout, se demostró que si bien las citocinas del perfil Th-1 participan en el control de *B. abortus* algunas tienen mayor relevancia, tal es el caso del IFN- γ , que parece tener un papel más importante que IL-12 (Brandao *et al.*, 2012). Por lo tanto, es necesario que cualquier inmunógeno sea capaz de

estimular la producción de todas las citocinas involucradas en la protección contra patógenos intracelulares, para el control temprano de la infección.

También es importante determinar la mejor ruta de administración para una vacuna ya que en un estudio se demostró que la relación huésped-patógeno es fuertemente afectada por la vía de infección (Demars *et al.*, 2019), ya que el patrón de infección de tejido parece que varía ampliamente dependiendo la ruta de infección.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la inmunidad conferida por el inmunógeno recombinante, no fue suficiente para evitar las manifestaciones clínicas ocasionadas por *B. melitensis* tras el desafío, y como en otros estudios se demuestra que las respuestas obtenidas en modelo murino difieren ampliamente con las que se pueden obtener en los hospederos afectados preferencialmente por ciertos patógenos, e incluso entre especies mayores puede haber estas diferencias (Ali *et al.*, 2018; Hull y Schumaker 2018). El inmunógeno es incapaz de inducir una respuesta inmune innata apropiada, lo que se demuestra por la baja expresión de citocinas necesarias para el control temprano de la infección y obviamente esto también se ve reflejado por que el inmunógeno no evitó la colonización de los órganos.

Es necesario realizar estudios con mayor número de refuerzos en el modelo de cabra, así como con diferentes dosis para tener soporte de si el inmunógeno puede ser usado y al mismo tiempo es práctico para la protección de las cabras contra la brucelosis.

}

9. -BIBLIOGRAFÍA

- Ali MDK, Du J, Gao Z, Tian Z, Zhang G, Huang D, Du R, Kang B, Liu B, Luo J, Yin H. Evaluation of the immune response afforded by a subunit vaccine candidate against bluetongue virus in mice and sheep. *Vet Microbiol.* 2018; 219: 40-48.
- Amjadi O, Rafiei A, Mardani M, Zafari P, Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infect Dis.* 2019, 51:5, 321-333
- Boschirola ML, Foulongne V, O'Callaghan. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology.* 2001; 4:58–64.
- Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front. Immunol.* 2013; 114 (4), 1-10.
- Bergmann LES, Wolfgang LW. Adjuvants in the Driver's Seat: How Magnitude, Type, Fine Specificity and Longevity of Immune Responses Are Driven by Distinct Classes of Immune Potentiators. *Vaccines.* 2014; 2, 252-296.
- Brandao MSAP, Oliveira FS, Carvalho NB, Vieira LQ, Azevedo V, Macedo GC and Oliveira SC. Host Susceptibility to *Brucella abortus* Infection Is More Pronounced in IFN- γ knockout than IL-12/ β 2-Microglobulin Double-Deficient Mice. *Clin Dev Immunol.* 2011; 2012, Article ID 589494.
- Burny W, Callegaro A, Bechtold V, Clement F, Delhaye S, Fissette L, Janssens M, Leroux-Roels G, Marchant A, van den Berg RA, Garçon N, van der Most R, Didierlaurent AM, E.-S. Group, Different adjuvants induce common innate pathways that are associated with enhanced adaptive responses against a model antigen in humans, *Front. Immunol.* 2017: (8) 943.
- Byndloss XM, Tsolis MR. *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2016. 4:111–27.
- Case EDR, Samuel JE. Contrasting Lifestyles Within the Host Cell. *Microbiol Spectr.* 2015; 4 (1), 1-19.
- Cassataro J, Pasquevich KA, Estein MS, Laplagne AD, Zwerdling A, de la Barrera S, Bowden R, Fossati AC, Giambartolomei HG, Goldbaum AF. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine.* 2007; 25: 5958-5967.
- Celli J. The intracellular life cycle of *Brucella* spp. *Microbiology Spectrum.* 2019, 7(2): BAI-0006-2019.
- Clapp B, Yang X, Thornburg T, Walters N and Pascual DW. Nas vaccination stimulates CD8+ T cells for potent protection against mucosal *Brucella melitensis* challenge. *Immunol and Cell Biol.* 2016; 94: 496-508.
- Commander NJ, Brewer JM, Wren BW, Spencer SA, MacMillan AP, Stack JA. Liposomal delivery of p-ialB and p-omp25 DNA vaccines

- improves immunogenicity but fails to provide full protection against *B. melitensis* challenge. *Genetic Vaccines and Therapy*. 2010; 8:5.
- Corbel MJ. Brucellosis: An Overview. *Emerging Infectious Diseases*.1997; 3(2): 213-221.
 - Curina G, Nardini R, Cornelia S, D'Avino N, Tentellina M, Montagnoli C, Severia G, Fortia K, Paternesid B, Coletti M and Cagiola M. Evaluation of immune responses in mice and sheep inoculated with a live attenuated *Brucella melitensis* REV1 vaccine produced in bioreactor. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018; 198: 44-53.
 - Czibener C, Merwaiss F, Guaimas F, Giudice MG, Rey SDA, Spera JM Ugalde JE. BigA is a novel adhesin of *Brucella* that mediates adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2015; 18 (4), 500-513.
 - Daniel M, Willett WJ, Crosson S. *Brucella abortus* induces a Warburg shift in host metabolism that is linked to enhanced intracellular survival of the pathogen. *J Bacteriol*. 2017; 199: e00227-17.
 - Demars A, Lison A, Machelart A, Van VM, Potemberg G, Vanderwinden JM, De Bolle X, Letesson JJ, Muraille E. Route of Infection Strongly Impacts the Host-Pathogen Relationship. *Front. Immunol*. 2019; 10, 1589-
 - Di Pascuale A, Preiss S, Da Silva FT, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*. 2015; 3, 320-343.
 - Diaz AE. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2013; 31 (1) 53-60.
 - Dorneles EMS, Teixeira CA, Araújo MSS, Sriranganathan N, Lage PA. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine*. 2015; 33: 3659-3666.
 - Ducrotoy MJ, Conde AR, Blasco JM, Moriyón I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016; 171: 81-102.
 - Durward MA, Harms J, Magnani DM, Eskra L and Splitter GA. Discordant *Brucella melitensis* antigens yield cognate CD8 T cells in vivo. *Infect Immun*. 2010; 78: 168-176.
 - Elfaki MG, Alaidan AA, Al-Hokail AA. Host response to *Brucella* infection: review and future perspective. *J Infect Dev Ctries*. 2015; 9(7):697-701.
 - Elzer PH, Hagius SD, Davis DS, DelVecchio VG, Enright FM. Characterization of caprine model for ruminant brucellosis 2002; 90: 425-431.
 - Ficht TA, Garry LA. Brucellosis. *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* 2009; Chapter 42; 807-829.
 - de Figueiredo P, Ficht TA, Ficht AR, Rossetti CA, Garry LA. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis Review of *Brucella*-Host Interactions. *Am J Pathol*. 2015; 185 (6): 1505-1517.
 - Godfroid J, Garin BB, Saegerman C, Blasco JM. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*. 2013; 32 (1) 27-42.

- Godfroid J, Scholze HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeck A, Blaschke JM, Moriyoni I, Saegerman J C, Mumak JB, Al Dahouk S, Neubauer H, Letessier J-J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med.* 2011; 102: 118-131.
- Gomes CP, Costa MG, Azevedo V, Costa OS. Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.* 2006; 5-13 doi:10.1186/1475-2859-5-13.
- Gomez G, Pei J, Mwangi W, Garry AL, Rice-Ficht A, Ficht TA. Immunogenic and Invasive Properties of Brucella melitensis 16M Outer Membrane Protein Vaccine Candidates identified via a Reverse Vaccinology Approach. *PLoS One* 2013; 8(3): e59751.
- Gutjahr A, Tiraby G, Perouzel E, Verrier B, Paul S. Triggering intracellular receptors for vaccine adjuvantation. *Trends Immunol.* 2015; 37, 573-587
- Guzmán HRL, Contreras RA, Avila CED, Morales GMR. Brucellosis: zoonosis de importancia en México. *Rev Chilena Infecto.* 2016; 33 (6): 656-662.
- Higgins LJ, Gonzalez JM, Bowen RA. Evaluation of shedding, tissue burdens, and humoral immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence vaccine strain Rev. 1. *PLoS One.* 2017; 12(10): 1-16.
- Higgins LJ, Bowen RA, Gonzalez JM. Cell mediated immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence strain Rev.1. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018; 202:74-84.
- Issa MN, Ashhab Y. Identification of Brucella melitensis Rev.1 vaccine-strain genetic markers: Towards understanding the molecular mechanism behind virulence attenuation. *Vaccine* 2016; 34: 4884-4891.
- Judith A. Smith, Mike Khan, Diogo D. Magnani, Jerome S. Harms, Marina Durward, Girish K. Radhakrishnan, Yi-Ping Liu, Gary A. Splitter. *Brucella* induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in Macrophages. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003785.
- Jung M, Shin MK, Jung YK, Yoo HS. Modulation of Macrophage activities in proliferation, lysosome and phagosome by the nonspecific immunostimulator, Mica. *PLoS One.* 2015; 10 (2), 1-18.
- Ke Zhang, Hui Wang, Fei Guo, Li Yuan, Wanjiang Zhang, Yuanzhi Wang and Chuangfu Chen. OMP31 of *Brucella melitensis* 16M impairs the apoptosis of macrophages triggered by TNF- α . *Exp Ther Med.* 2015; 12: 2783-2789.
- Kulakov KY. Molecular aspects of *Brucella* persistence. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2015; 31, 3-8.

- Littauer QE y Skountzou Ioanna. Hormonal regulation of physiology, innate immunity and antibody response to H1N1 Influenza virus infection during pregnancy. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2455
- Martínez LJE, Terán MC. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 19–30.
- Martirosyan A, Jean PG. Brucella evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol.* 2013; 8(2), 147–154.
- Martirosyan A, Moreno E, Gorge JP. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen. *Immunol Rev.* 2011; 240: 211–234.
- Mohamed G Elfaki, Alwaleed Abdullah Alaidan, Abdullah Abdulrahman Al-Hokail. Host response to *Brucella* infection: review and future perspective. *J Infect Dev Ctries.* 2015; 9(7):697-701.
- Neta CAV, Mol SJP, Xavier NM, Paixão AT, Lage PA, Santos LR. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J.* 2010; 184: 146-155.
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales. “Núm. 041 y sección 7” (“1995”).
- Olsen S, Tatum F. Bovine Brucellosis. *Vet Clin Food Anim.* 2010; 26: 15-27.
- Osman YA, Jesse AFF, Abdul KA, Azis SA. Immuno-pathophysiological responses of mouse model to experimental infection with *Brucella melitensis* and its lipopolysaccharides via intraperitoneal route. *Microb Pathog.* 2016; 100:17-29.
- Pappas G. Bacteria: *Brucella*. *Encyclopedia of food safety.* Volume 1. 2014; 364-368.
- Poester FP, Samartino LE, Santos RL. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 2013; 32: 105-115.
- Rossetti CA, Arenas GAM, Maurizio E. Caprine brucellosis: A historically neglected disease with significant impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(8): 1-17.
- Samartino EL, Enright MF. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immun Microbiol infect Dis.* 1993; 16 (2): 95-101.
- Salmon DM, Kornspan D. Transcriptomic analysis of smooth versus rough *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strains reveals insights into virulence attenuation. *Int. J. Med. Microbiol.* 2020; 310: 151363.
- Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 479-496.
- Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucella: A pathogen without classic virulence genes. *Vet Microbiol.* 2008; 129, 1–14.
- Teresa García-Seco, Marta Pérez-Sancho, Jesús Salinas, Alejandro Navarro, Alberto Díez-Guerrier, Nerea García, Pilar Pozo, Joaquín Goyache, Lucas Domínguez and Julio Álvarez. Effect of preventive *Chlamydia abortus* vaccination in offspring development in sheep challenged experimentally. *Front Vet Sci.* 2016; 3: 67; 1-11.
- Theron J, Thantsha MS. Brucella characteristics. *Encyclopedia of Food Microbiol.* 2014: 1, 319–324.

- Toussi DN and Massari P. Immune Adjuvant Effect of molecularly defined Toll-Like Receptor ligands. *Vaccines*. 2014: 2, 323-353.
- Vitry MA, Hanot MD, Trez CD, Akira S, Ryffel B, Letesson JJ, Muraille E. Humoral immunity and CD4⁺ Th1 Cells are both necessary for a fully protective immune response upon secondary infection with *Brucella melitensis*. *J Immunol*. 2014: 192, 3740-3752.
- Vitry MA, Trez CD, Goriely S, Dumoutier L, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. Crucial role of gamma interferon-producing CD4⁺ Th1 Cells but dispensable function of CD8⁺ T Cell, B Cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* Infection in Mice. *Infect Immun*. 2012: 80, 4271–4280.
- Waqas A, Ke Z, Liu ZF. Establishment of chronic infection: Brucella's stealth strategy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 6 (30): doi: 10.3389.
- Yingst S, Hoover DL. T Cell immunity to brucellosis. *Crit Rev Microbiol*. 2008: 29(4):313–331.
- Zhao Y, Hanniffya S, Arce GV, Raquel Conde AR, Oh S, Moriyón I, Mémet S, Gorvel JP. Immunomodulatory properties of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide determinants on mouse dendritic cells *in vitro* and *in vivo*. *Virulence*. 2018: 9:1, 465-479.

APENDICE

Ensayo de bovigam ®.

Las placas estaban a temperatura ambiente.

- Los controles positivos y negativos: se almacenaron a 5°C (hasta por 3 meses), antes de su uso se debieron estar a temperatura ambiente y haber sido homogenizados. Se colocaron 50µl en los pozos correspondientes.
- Se agregaron 50µl del *Green diluent* a cada pozo.
- Se agregaron 50 µl de muestra por pozo (se pipetea cinco veces)
- Se cubrió la placa con el “lid” y se incubó a temperatura ambiente sobre un agitador de placas a 4 g durante 60 min.
- Se retiró el contenido de los pocillos y se lavó 6 veces con el buffer de lavado a temperatura ambiente (200 µl por cada lavado), después del último lavado nos aseguramos de que el pozo quedó seco.
- Se añadieron 100 µl de conjugado (freshly conjugate reagent) que previamente se diluyó a una concentración de 1:10 con “Working strength blue diluent”.

- Se cubrió la placa con el “lid” y se incubó a temperatura ambiente sobre un agitador de placas a 4 g durante 60 min.
- Se retiró el contenido de los pocillos y se lavó 6 veces con el buffer de lavado a temperatura ambiente (200 μ l por cada lavado), después del último lavado nos aseguramos de que el pozo quedó seco.
- Se añadió 100 μ l del “freshly prepared enzyme-sustrate solution” (previamente preparado a una dilución 1:10).
- Se cubrió la placa con el “lid” y se incubó a temperatura ambiente sobre un agitador de placas a 4 g durante 30 min.
- Se añadió 50 μ l de “Enzyme stoppin solution”.

Se dejó durante cinco minutos y llevó a lectura a 450 nm. Los valores de absorbancia se usaron para calcular los resultados.

Proyecto financiado por CONACYT-TAMU No.2015-044 y Proyecto PAPIIT171225