



Universidad de Concepción
Dirección de postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias mención Microbiología

**Evaluación de la respuesta inmune heteróloga conferida
por la vacuna *Brucella abortus* RB51 en modelo murino
contra *Brucella canis* cepa RM6/66.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención
Microbiología

**JUAN ESTEBAN LÓPEZ SALDIVIA
CONCEPCIÓN-CHILE
2025**

Profesor Guía: Dr. Leonardo Antonio Gómez Roa
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Leonardo Gómez Roa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Roberto Vidal Álvarez
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Tomás Casanova Bustos
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Angel Oñate Contreras
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XI
1.1 Brucelosis canina.....	12
1.2 Seroprevalencia mundial y nacional de brucelosis canina.....	14
1.3 Vías de ingreso del patógeno en perros.....	15
1.4 Fases de infección en perros	16
1.5 Sintomatología de la brucelosis canina.....	17
1.6 Respuesta inmune durante la brucelosis.....	19
1.7 Respuesta inmune en perros frente a B. canis	22
1.8 Inmunidad en las barreras mucosas frente a Brucella.....	23
1.9 Vacunas intranasales para mejorar la inmunidad en mucosa genital	25
1.10 Vacunas contra B. canis	29
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1 Animales experimentales.....	33
2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	33
2.3 Extracción de proteínas totales de Brucella	34
2.4 Preparación de gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
2.5 Inmunizaciones	38

2.6	Producción de inmunoglobulinas.....	38
2.7	Ensayo bactericida del suero (SBA) adaptado a moco vaginal.....	39
2.8	Estudio de linfoproliferación de esplenocitos por citometría de flujo	40
2.9	Producción de citoquinas.....	41
2.10	Ensayos de protección.....	44
2.11	Análisis estadístico.....	44
3	RESULTADOS.....	45
3.1	Detección de las proteínas totales	45
3.2	Evaluación de la respuesta inmune	46
3.2.1	Evaluación de la respuesta inmune humoral	46
3.2.2	Evaluación de vaginal SBA.....	56
3.2.3	Deteccion de citoquinas y linfoproliferación	58
3.3	Ensayo de protección.....	61
4	DISCUSIÓN	64
5	CONCLUSIONES	79
6	BIBLIOGRAFIA.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Inducción de respuesta inmune en cavidad nasal.	26
Figura 2: Activación del sistema común de mucosas por vía intranasal.	28
Figura 3: Diseño experimental del proceso de inmunización y evaluación inmune.	37
Figura 4: Diseño experimental para ensayos de protección.....	43
Figura 5: Detección de proteínas totales de las cepas RB51 y RM6/66 por SDS-PAGE.....	45
Figura 6: Respuesta de anticuerpos IgM en suero.....	47
Figura 7: Respuesta de anticuerpos IgG en suero.	49
Figura 8: Respuesta de anticuerpos IgG2a en suero.....	51
Figura 9: Respuesta de anticuerpos IgA en suero.	53
Figura 10: Respuesta de anticuerpos IgA en moco vaginal.....	55
Figura 11: Ensayo bactericida del suero (SBA) adaptado a moco vaginal.....	57
Figura 12: Secreción de citoquinas por linfocitos estimulados <i>in vitro</i>	60
Figura 13: Recuento de colonias de cepa RM6/66 en bazo.	62
Figura 14: Activación del sistema común de mucosas por vía intranasal con RB51.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Ensayo de protección.	63
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 3.4. Curva de Kaplan-Meier de ratones BALB/c tras desafío con cepa RM6/66.	104
--	-----

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Ángel Oñate y al Dr. Leonardo Gómez por la confianza que depositaron en mí al acogerme en su laboratorio, permitiéndome aprender sobre brucelosis canina e inmunología. Su guía y disposición fueron fundamentales para mi formación.

De igual forma, agradezco con cariño a Andrea, Jimenita y Juanita, quienes con su amabilidad y constante sonrisa hicieron de mi paso por la facultad una experiencia grata y acogedora. Gracias a ustedes, este lugar no solo fue mi institución académica, sino también mi segundo hogar.

A mis padres, por su incansable apoyo económico y preocupación constante. Sin su respaldo, este camino no habría sido posible. Gracias por estar siempre.

A Maiky, Carito, Elías, Antonia, Pablo, Ely y la Nini: ustedes fueron mi refugio emocional. Gracias por su amistad, por su cariño incondicional, por aceptarme tal como soy y por acompañarme tanto en los momentos de alegría como en los días difíciles.

Quisiera cerrar con una frase que me ha acompañado desde mi infancia y que resume el espíritu con el que enfrenté este desafío:

*“Si tú lo deseas, puedes volar.
Solo tienes que confiar mucho en ti y seguir.”*
— Hidenori Chiwata

RESUMEN

Brucella canis es el agente etiológico de la brucelosis canina, una enfermedad zoonótica con una seroprevalencia del 7,3 % en perros en Chile. Su presentación clínica es inespecífica, manifestándose principalmente como infertilidad. Ante la ausencia de tratamientos eficaces y vacunas aprobadas, en este estudio se evaluó la inmunogenicidad y la protección heteróloga conferida por la vacuna *Brucella abortus* RB51 en ratones BALB/c frente a la cepa *B. canis* RM6/66, con énfasis en la respuesta inmune a nivel de mucosas. Los animales fueron inmunizados por vía intranasal o intraperitoneal con *B. abortus* RB51. La inmunogenicidad se evaluó mediante la titulación y funcionalidad de los anticuerpos, junto con la determinación de los niveles de citocinas, mientras que la protección conferida se analizó a través del recuento bacteriano en bazo tras el desafío con *B. canis* RM6/66 por vías intravaginal e intraperitoneal. La inmunización intranasal indujo niveles de IgA anti-*B. canis* capaces de aglutinar al patógeno y activar el complemento, además de estimular la producción de TNF- α e IFN- γ . Los ratones inmunizados por vía intranasal presentaron un índice de protección de 2,13 en bazo. Estos resultados sugieren que esta administración podría constituir una estrategia eficaz para la prevención de la brucelosis canina, destacando la relevancia de profundizar en los mecanismos de inmunidad de mucosas inducidos por esta vacuna.

ABSTRACT

Brucella canis is the etiological agent of canine brucellosis, a zoonotic disease with a seroprevalence of 7.3% in dogs in Chile. Its clinical presentation is usually nonspecific, most commonly manifested as infertility. Due to the absence of effective treatments and approved vaccines, this study evaluated the immunogenicity and heterologous protection conferred by the *Brucella abortus* RB51 vaccine in BALB/c mice against the *B. canis* RM6/66 strain, with an emphasis on the mucosal immune response. Animals were immunized intranasally or intraperitoneally with *B. abortus* RB51. Immunogenicity was assessed by antibody titers and functional activity, together with cytokine quantification, while protection was analyzed through bacterial counts in the spleen after challenge with *B. canis* RM6/66 via intravaginal or intraperitoneal routes. Intranasal immunization induced anti-*B. canis* IgA antibodies capable of agglutinating the pathogen and activating complement, as well as stimulating the production of TNF- α and IFN- γ . Mice immunized intranasally showed a splenic protection index of 2.13. These results suggest that intranasal administration of *B. abortus* RB51 could represent an effective strategy for the prevention of canine brucellosis, highlighting the importance of further investigation into the mucosal immune mechanisms induced by this vaccine.

INTRODUCCIÓN

1.1 Brucelosis canina

Brucella canis es el agente etiológico de la Brucelosis canina, una enfermedad zoonótica caracterizada por una alta seroprevalencia a nivel mundial (Santos *et al.*, 2021). Este patógeno es una bacteria cocobacilar Gram negativa, que se presenta de forma individual o en cadenas cortas, inmóviles y que sobreviven y replican intracelularmente (Chacón-Díaz *et al.*, 2015). Su metabolismo es aeróbico, siendo catalasa y oxidasa positivas. En cultivo, las colonias se observan inicialmente pequeñas (1-5 mm), translúcidas, con un leve tono azulado, de bordes definidos y mucoides en el primer aislamiento; con el transcurso de los días, las colonias se tornan opacas y de un mayor tamaño (Borie and Galarce, 2015). Desde un punto de vista estructural, *B. canis* se diferencia del resto de las especies del género *Brucella* por corresponder, junto a *B. ovis*, al grupo de las "Brucellas rugosas", caracterizadas por su escasa cantidad o ausencia total del antígeno O del lipopolisacarido (LPS) (Borie and Galarce, 2015; Fox *et al.*, 1998).

Desde el punto de vista genómico, el género *Brucella* está constituido por especies reconocidas como clásicas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* y *B. ovis*), las cuales comparten más de un 94% de similitud genética (Rajashekara *et al.*, 2004, Suárez-Esquivel *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2024). Dos

características genéticas de *Brucella* que llaman la atención son la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y la ausencia de plásmidos (Yang *et al.*, 2024). Esta última característica refleja probablemente la adaptación a un nicho ecológico estable y sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que se deriva de los plásmidos (Whatmore, 2009). Se estima que el 8% del genoma de *Brucella* es destinado a funciones necesarias para la sobrevivencia y la virulencia (Rivers *et al.*, 2006). Además, las especies de *Brucella* exhiben un rango de hospederos específicos, aunque no del todo estricto; una característica que habría tenido un ancestro en común, el cual no presentaba preferencia por un mamífero terrestre específico (Whatmore, 2009, Whatmore and Foster, 2021). Interesantemente, se ha postulado que la especiación de estas bacterias se asociaría a cambios entre las poblaciones de forma gradual a medida que el hospedero iba evolucionando y, por lo tanto, creando grupos genéticamente vinculados a sus hospederos específicos más que a sus diferencias genéticas (Whatmore, 2009, Whatmore and Foster, 2021). Esto explicaría la cantidad de especies de *Brucella* existentes y su conservado perfil de proteínas presentes en estos microorganismos (Moreno *et al.*, 2002).

1.2 Seroprevalencia mundial y nacional de brucelosis canina

A nivel mundial, se pueden identificar áreas geográficas donde la brucelosis es más prevalente, es así que en países de medio oriente continental se encuentra la prevalencia más alta con un 48.7% (Santos *et al.*, 2021). Además, la infección es común en América Central y Sudamérica. A principios del 2000 en Sudamérica, Brasil fue el país que presentaba las mayores tasas de prevalencia a nivel regional, entre 0.84 a 58.3% (Noyma *et al.*, 2009). En la actualidad, el país con mayor prevalencia en Sudamérica, es Argentina, con 15.5%, desplazando al segundo lugar a Brasil con 10.5%, seguido por Colombia con 7.7% y Chile con 7.3% (Santos *et al.*, 2021).

En Chile, la mayor cantidad de estudios realizados de seroprevalencia corresponde a la Región Metropolitana, teniendo una prevalencia del 13% (Borie *et al.*, 2002). En la comuna de San Bernardo se ha observado una prevalencia del 11.25% (Obrist, 2005), mientras que en clínicas veterinarias de Santiago se ha registrado un 16.8% (Gómez, 2007). Además, en operativos de esterilización realizados en el Gran Santiago se ha registrado una prevalencia del 8.7% (Sanchez, 2017). Los estudios publicados en regiones, específicamente utilizando datos de criaderos presentes en la ciudad de Curicó, se ha detectado una prevalencia de un 18.18% (Troncoso *et al.*, 2013), mientras

que en perros callejeros de la ciudad de Temuco alcanza valores de 1% (Tuemmers *et al.*, 2013).

1.3 Vías de ingreso del patógeno en perros

La infección en perros ocurre por cualquier mucosa a través de la exposición directa de secreciones que contengan entre 1 a 2×10^6 UFC de *B. canis* (Davidson and Sykes, 2014; Olivera *et al.*, 2011). En las hembras, el ingreso por mucosa genital postmonta o por mucosa buconasal/conjuntival con exudados vaginales es la vía de transmisión más frecuente (Carmichael and Greene, 2008). Una vez infectadas, las hembras eliminan secreciones después del aborto, por periodos de hasta seis semanas. Interesantemente, se ha descrito que la vía de ingreso del patógeno que requiere de una menor carga bacteriana corresponde a la mucosa conjuntival (10^4 a 10^5 UFC) (Carmichael, 2000). Además, la transmisión también puede ocurrir a través de la leche, transplacentaria y por la vía oronasal en condiciones de hacinamientos en perreras (Davidson and Sykes, 2014). En los machos, el líquido seminal y la orina se consideran fuentes de infección, ya que alojan a los microorganismos en la próstata y el epidídimo. La excreción urinaria se inicia a unas cuantas semanas tras el comienzo de la bacteriemia y continúa hasta varios meses (Carmichael and Greene, 2008). En estos animales, las concentraciones de bacterianas se encuentran entre 10^3 a 10^6 UFC/ml de orina, siendo mayor que

en hembras. En semen, la concentración de *B. canis* suele ser alta durante las primeras 6 a 8 semanas post infección y puede observarse una eliminación intermitente del microorganismo en pequeñas cantidades hasta las 60 semanas post infección y en algunos casos, hasta 2 años (Carmichael and Greene, 2008).

1.4 Fases de infección en perros

La infección en perros puede ocurrir por cualquier mucosa, la cual genera un período de incubación variable. Luego, el paso de las bacterias a la sangre produce una bacteriemia que pueden observarse entre una y cuatro semanas post-infección, correspondiente a la fase aguda (Hollett, 2006). Durante esta etapa, *B. canis* coloniza diversos tejidos, incluyendo linfonodos, bazo, médula ósea y tracto reproductivo. En sangre, las concentraciones pueden superar 10^3 bacterias/mL al mes de infección (Carmichael, 2000). El signo clínico característico de esta fase es la fiebre ondulante, acompañada de decaimiento y anorexia intermitente (Carmichael, 2000).

La duración de la bacteriemia en los perros es variable ya que en algunos casos es transitoria, o puede extenderse por seis meses o incluso persistir por uno, dos o incluso cinco años (Carmichael *et al.*, 1984). Tras la resolución de la bacteriemia, las bacterias pueden permanecer en tejidos como el bazo, linfonodos, médula ósea, próstata y epidídimo por períodos prolongados (Carmichael, 2000). Este comportamiento, caracterizado por una alternancia

entre fases de bacteriemia y abacteriemia, complica el diagnóstico y favorece el subdiagnóstico de la enfermedad. Por este motivo, se recomienda el uso combinado de métodos serológicos, PCR y cultivo bacteriano para su detección (Sánchez, 2017). Cabe destacar que el tipo de muestra y el método diagnóstico deben seleccionarse de acuerdo con la fase clínica ya que la sangre resulta útil únicamente durante la bacteriemia, mientras que en la abacteriemia es preferible utilizar orina, semen o tejido testicular en machos (Sánchez, 2017). Aunque la detección de anticuerpos contra antígenos de *Brucella* es ampliamente utilizada, sus resultados deben interpretarse con precaución, dado que pueden ser negativos en fases de abacteriemia o cronicidad, situación que también se observa en los cultivos bacterianos (Sánchez, 2017). Además, la bacteriemia puede reactivarse en situaciones de estrés, contribuyendo a la complejidad de la enfermedad y dificultando aún más su diagnóstico. Adicionalmente, la infección por *B. canis*, a través del establecimiento de esta bacteria en los tejidos, produce una fase crónica que se prolonga por más de tres meses con una persistencia o progresión de los signos clínicos previamente descritos (Pellegrini *et al.*, 2022, Cosford, 2018).

1.5 Sintomatología de la brucelosis canina

En perros la sintomatología de esta enfermedad está principalmente asociada al tracto reproductivo de ambos sexos (Carmichael, 2000). En perras gestantes

causa absorción embrionaria, abortos y mortinatos. Muchas de las muertes embrionarias tempranas con reabsorción ocurridas a un par de semanas del apareamiento y el aborto en embriones de 10 a 20 días post cruce pasan inadvertidos, ya que son confundidos con fallas en la concepción (Holleth, 2006). Además, los abortos pueden ocurrir en cualquier periodo de la gestación, pero generalmente ocurren después de los 45 a 55 días (séptima a novena semana de gestación), seguidos por un flujo vaginal verde mucoso, serosanguinolento o gris que persiste por hasta seis semanas (Sanchez, 2017). Si no hay aborto, los mortinatos mueren en las primeras 24 horas por debilidad o sobreviven quedando permanentemente infectados (Carmichael, 2000). Se ha descrito que sobre el 85% de las hembras que abortan por *B. canis* pueden concebir camadas normales en los siguientes partos. Raramente, las hembras pueden abortar más de 4 veces consecutivas y tener más de 3 apareamientos sin éxito consecutivos (Carmichael, 2000).

Por otro lado, en los machos, esta infección genera orquitis en fase aguda, con espermatozoides anormales y lisados con presencia de células inflamatorias en el eyaculado, especialmente durante los primeros 3 meses luego de la infección (Carmichael, 2000). En fase crónica hipogonadismo bilateral o unilateral con infertilidad, prostatitis y disminución del líbido. A nivel histológico las lesiones testiculares que se observan con alteración de la barrera hematotesticular, con

infiltración eritrocitaria tubular y cambios anormales morfológicos en la línea espermatozoaria (Borie *et al.*, 2002), de igual manera que en la hembra, se puede evidenciar secreciones verde mucoides o gris acumulados en el prepucio del perro (Carmichael and Greene, 2008, Sanchez, 2017). Adicionalmente, esta enfermedad puede provocar otros signos clínicos, los cuales se presentan con menor frecuencia, tales como discoespondilitis, poliartritis, glomerulonefritis y uveítis con edema corneal (Carmichael and Greene, 2008).

1.6 Respuesta inmune durante la brucelosis

La respuesta inmune innata frente a la infección por *Brucella* sp. Inicia con elementos de la inmunidad innata, la cual involucra a una serie de elementos tales como proteínas del complemento, células dendríticas (DCs), macrófagos y células asesinas naturales (NK) (Fernández Prada *et al.*, 2001a). Las proteínas del complemento, activadas principalmente por la vía clásica, facilitan la opsonización y fagocitosis inicial del patógeno (Fernández Prada *et al.*, 2001b). Sin embargo, *Brucella* sp. emplea estrategias de evasión inmune que le permite sobrevivir y replicarse dentro de macrófagos y DCs escapando de la acción de estas moléculas (Martirosyan *et al.*, 2011; de Figueiredo *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2012). Por otro lado, las DCs y macrófagos que fagocitan a *Brucella* sp. Y liberan diversas citoquinas tales como interleucina-12 (IL-12), la cual activa a las células NK (Golding *et al.*, 2001). A su vez, estas células producen

interferón gamma (IFN- γ), crucial en la activación de los macrófagos y la eliminación de patógenos intracelulares (Montalvilho *et al.*, 2014). Aunque la inmunidad innata por sí sola no logra erradicar la infección, desempeña un papel fundamental al activar el sistema inmune adaptativo (Gomes *et al.*, 2012; Vorster and Mapham. 2013; López-Santiago *et al.*, 2019).

La inmunidad adaptativa frente a *Brucella* se asocia a la activación de sus dos brazos principales: la inmunidad humoral y celular, cada una con mecanismos específicos y roles complementarios para combatir la infección (Abbot and Smith, 2020). Así, la inmunidad humoral a través de la producción de anticuerpos por células plasmáticas, incrementa principalmente los niveles sistémicos de IgM e IgG, los cuales detectan a *Brucella* cuando se encuentra fuera de su ciclo intracelular (Allen and Adams. 2010; Rojas and Berrios. 2014; Atluri *et al.*, 2011). Los anticuerpos activan el sistema del complemento, lo que facilita la lisis bacteriana mediante la formación de complejos de ataque a la membrana (Hoffmann and Houle, 1995) y promueven la fagocitosis de *Brucella* por los macrófagos (Huy *et al.*, 2022; Mazumdar *et al.*, 2022; Gutiérrez-Jiménes *et al.*, 2019). Este proceso, aunque útil para eliminar a la bacteria, también puede favorecer su persistencia y cronicidad, ya que *Brucella* es capaz de utilizar los macrófagos como nichos intracelulares,

evadiendo así las respuestas inmunitarias extracelulares (Martirosyan and Gorvel. 2013).

Por otro lado, la inmunidad celular es esencial en la eliminación de *Brucella*, siendo los linfocitos T (CD4⁺) helper tipo 1 (Th1) y los linfocitos T (CD8⁺) citotóxicos son fundamentales en este proceso (García-Samartino. 2010; Zheng *et al.*, 2019; Byndloss and Tsolis. 2021; Rossetti *et al.*, 2015). Los linfocitos Th1 regulan la maduración de las DCs y su capacidad para presentar antígenos, y promueven la producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (NO) en los macrófagos, compuestos que son utilizados para eliminar bacterias fagocitadas (Sher and Coffman. 2001; Münz *et al.*, 2005). También, estos linfocitos pueden inducir apoptosis en células infectadas por bacterias intracelulares (Pesce *et al.*, 2022). Asimismo, los Th1 también contribuyen a la proliferación clonal de linfocitos T CD8⁺ mediante la producción de interleucina-2 (IL-2) (Chen *et al.*, 2023), linfocitos que eliminan directamente las células infectadas con *Brucella*, previniendo su diseminación intracelular (Balin *et al.*, 2018, Tian *et al.*, 2022).

La activación de estos linfocitos Th1 CD4⁺ y T CD8⁺ citotóxicos productores de IFN- γ es crucial para inducir en ratones la producción de anticuerpos IgG2a por las células plasmáticas, garantizando una respuesta inmunitaria adaptativa eficaz contra *Brucella* (Stein and Phipps. 1992). Este equilibrio permite una

coordinación óptima entre la inmunidad celular y humoral, lo que resulta indispensable para la eliminación del patógeno (López-Santiago *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2012; Leyan *et al.*, 2015; Dadelahi *et al.*, 2020). Sin embargo, la activación inadecuada o insuficiente de los linfocitos Th1 puede comprometer seriamente la capacidad del sistema inmune para controlar la infección y eliminar a *Brucella* sp. de manera efectiva (Martirosyan *et al.*, 2011). De este modo, la inmunidad celular liderada por los linfocitos Th1 y linfocitos T CD8⁺, son componentes esenciales en la lucha contra *Brucella* sp., los cuales contribuyen significativamente a la eliminación del patógeno y previenen su persistencia crónica en el hospedero (Oliveira. 2021; Guo *et al.*, 2023; Rivers *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2023).

1.7 Respuesta inmune en perros frente a *B. canis*

En perros, la infección con *B. canis* incrementa la producción de citoquinas IL-12, IFN- γ y TNF- α en DCs, las cuales activan linfocitos Th1 (Pujol *et al.*, 2017, Pujol *et al.*, 2019). Adicionalmente, niveles elevados de IL-6 e IL-17 asociadas a la activación de linfocitos Th17 también han sido reportadas (Pujol *et al.*, 2017). La activación de los linfocitos Th17 aunque efectivas contra infecciones bacterianas extracelulares y fúngicas, son consideradas ineficaces para controlar las infecciones bacterianas intracelulares (Audic *et al.*, 2009). Además, la activación de estos linfocitos Th17 se asocian a respuestas inmunes

dañina asociada a trastornos autoinmunes en los tejidos óseos (Giambartolomei *et al.*, 2012). Esto ha hecho suponer que la respuesta Th17 generada durante la brucelosis canina, podría contribuir con la patogenicidad de la enfermedad en perros infectados, la cual se asociaría principalmente a las lesiones óseas características en la región sacral (Pujol *et al.*, 2017). Por lo tanto, es posible que el balance Th1/Th17 es un fenómeno que debe ser finamente ajustado durante la brucelosis, el cual al ser alterado puede afectar el desarrollo de una respuesta Th1 efectiva contra *B. canis* (Pujol *et al.*, 2019).

1.8 Inmunidad en las barreras mucosas frente a *Brucella*

La infección en perros y otros mamíferos por *Brucella* suele ocurrir a través de los tejidos mucosos. Estas superficies incluyen la cavidad oral, las vías respiratorias, el tracto genitourinario y el tracto gastrointestinal, las cuales representan sitios altamente vulnerables a la penetración, colonización e invasión de estos patógenos (Jonhstone y Herzberg, 2022; Juge, 2022; Zaldívar-Ochoa, 2002). Las mucosas se asocian a tejidos linfoides que desempeñan un papel fundamental en su protección. Estas estructuras sirven como alojamiento y facilitan el tránsito de células del sistema inmune innato y adaptativo, garantizando una respuesta coordinada y eficaz frente a amenazas en estas superficies vulnerables (Randall and Mebius, 2014, Cesta, 2006). Estas reacciones inmunes se producen en el tejido linfoide asociado a las mucosas

(MALT, por sus siglas en inglés), el cual incluye componentes distribuidos en múltiples ubicaciones anatómicas, como el tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario, y que actúan como primera línea de defensa en las interfaces de las mucosas (Nabekura and Shibuya, 2021; Ruddle and Akirav, 2009; Piersma, 2024; Valle-Noguera *et al.*, 2021).

La inmunidad en estos tejidos durante la infección por *Brucella* no ha sido completamente estudiada; sin embargo, se espera que se produzca una respuesta inmune protectora asociada a los linfocitos Th1 y T citotóxicos (Van Ginkel *et al.*, 2000; Muraille *et al.*, 2014). Estas respuestas serían acompañadas por la producción de anticuerpos IgA secretoras (s-IgA), las cuales proveerían una línea de defensa muy importante contra la invasión por *Brucella* hacia los tejidos (Mantis *et al.*, 2011, Corthésy, 2013). En estos tejidos las s-IgA constituyen en más del 80% de todos los anticuerpos producidos por el MALT (Bamias *et al.*, 2023). Además, los anticuerpos de s-IgA no solo están presentes en las secreciones externas, sino también ejercen propiedades antimicrobianas en las células epiteliales, brindando una protección inmune específica para todas las superficies mucosas debido a su capacidad de bloquear la penetración al organismo de agentes patógenos (Brandzaeg, 2013). Entre sus funciones están la capacidad de inhibir la adherencia bacteriana, la neutralización de enzimas y toxinas secretadas por estos patógenos (factores de virulencia) y la

neutralización de virus (Corthésy y Spertin, 1999; Sánchez-Salguero y Santos-Argumedo, 2018; Mantis *et al.*, 2011). La inmunidad de mucosas, específicamente en los tejidos del tracto genital femenino como es el útero, una región que ha sido muy poco estudiada durante infecciones o nada estudiada en el contexto de *B. canis*. Estos tejidos generan una respuesta inmune clave durante el ingreso de este patógeno, la cual debe ser considerada específicamente durante las estrategias de vacunación.

1.9 Vacunas intranasales para mejorar la inmunidad en mucosa genital

El desarrollo de vacunas intranasales contra enfermedades de transmisión sexual tiene por objetivo de inducir inmunidad en la mucosa genital. La administración de antígenos vacunales en la cavidad nasal permite activar la respuesta inmune asociada al NALT (Figura 1), donde los linfocitos son programados para viajar (“homing”) y responder en tejidos mucosos distantes como es el tracto genital femenino. Este “homing” leucocitario se produce debido a la expresión en la superficie de los linfocitos de receptores de integrinas y quimioquinas expresadas específicamente en determinados tejidos mucosos.

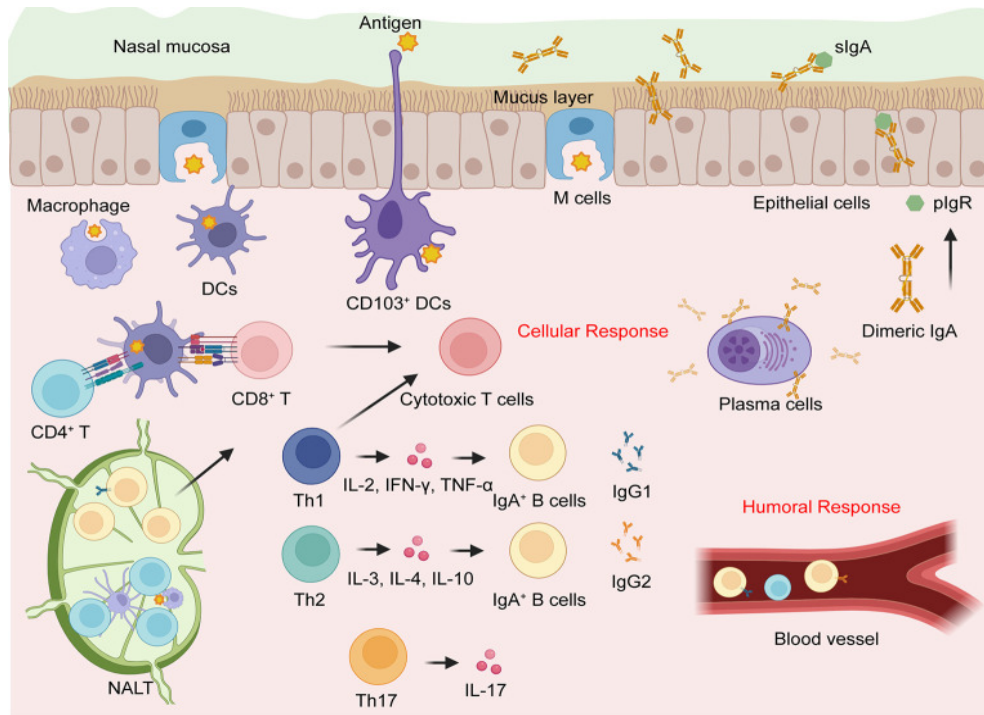


Figura 1 : Inducción de respuesta inmune en cavidad nasal.

El tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) está compuesto por células epiteliales y células microplegadas (M), especializadas en la captación de antígenos. Las células M endocitan antígenos y los transportan a las células presentadoras de antígenos (CPA) para su procesamiento y presentación. Posteriormente, las CPA migran hacia la zona interfolicular de NALT donde se encuentran linfocitos T y una zona folicular con linfocitos B. La activación de estas células lleva a la producción de IgA que al unirse al receptor de Ig polimérico (pIgR) de las células epiteliales permite su transporte al lumen de la cavidad nasal en forma de IgA secretora (sIgA) (Bai *et al.*, 2024).

La inmunización intranasal (i.n) ha sido estudiada en infecciones con virus herpes simple tipo 2 (HSV-2), demostrándose que la inmunización i.n. con virus mutante atenuado induce una respuesta robusta de linfocitos T CD4⁺ de memoria efectora (Tem) productores de IFN- γ en el tejido vaginal. Estas serían las responsables de prevenir una inflamación severa y reducir la carga viral en la zona genital a partir del tercer día post-desafío (Nochi *et al.*, 2014). De forma similar, la vacunación i.n. contra *Chlamydia trachomatis*, usando cepas inactivadas con UV, generaron dos oleadas de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ (Stary *et al.*, 2015). La primera fue generada tras la administración i.n. de la vacuna, la cual generó linfocitos T CD4⁺ de memoria residentes de tejido (Trem) en mucosas y Tem CD4⁺ en la circulación sistémica, específicos contra *C. trachomatis*. La segunda oleada ocurrió durante el desafío postvacunal, donde se registró una migración de Tem CD4⁺ hacia el tejido vaginal, los cuales contribuyen a una eliminación efectiva del patógeno (Figura 2, Stary *et al.*, 2015). Estos resultados demuestran que los Trm CD4⁺ o CD8⁺ generados durante la vacunación intranasal, son fundamentales para la inmunidad de mucosas ya que actúan como barreras de primera línea, respondiendo de forma rápida, específica y eficaz ante la presencia de patógenos. Adicionalmente, la evidencia muestra que los Tem refuerzan esta respuesta y permiten la erradicación del agente infeccioso (Hassert and Harty, 2022).

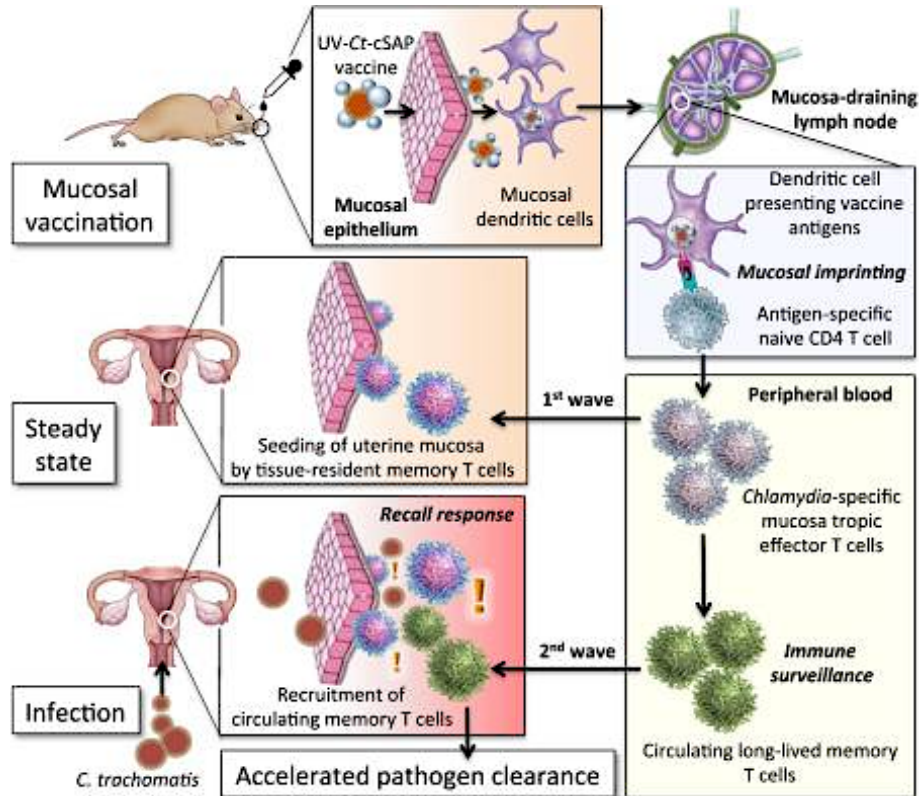


Figura 2: Activación del sistema común de mucosas por vía intranasal.

En la vacunación i.n., las células dendríticas transportan los antígenos (ej. UV-Ct-cSAP) hacia los ganglios linfáticos regionales activando linfocitos T CD4⁺ naive. Los linfocitos T inducidos por la vacunación migran hacia la mucosa uterina, conformando una primera oleada que establece linfocitos T de memoria residentes en tejidos (Trm). Paralelamente, la vacunación genera un reservorio de células T de memoria circulantes. Durante una infección genital por el patógeno se produce una reactivación local de las Trm uterinas desencadenando el reclutamiento de los linfocitos T efectores circulante (segunda oleada). La eliminación eficiente del patógeno requiere la acción coordinada de ambas oleadas de células de memoria (Stary *et al.*, 2015).

1.10 Vacunas contra *B. canis*

En la actualidad no existe una vacuna para perros que proteja de *B. canis* (Borie *et al.*, 2022). La publicación más actual, es de *B. canis* RM6/66 Δ vjbR, un candidato vivo atenuado provado en ratones, el cual presenta la delección del gen vjbR, codificante de un regulador transcripcional del quórum sensing (Liu *et al.*, 2020). Este regulador, similar a LuxR, es requerido para la expresión del operón virB en *Brucella*, y es fundamental para la supervivencia y virulencia bacteriana en fagocitos y en ratones (Liu *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha utilizado la proteína BLSOmp31 formulado con diferentes adyuvantes como un candidato capaz de inducir una buena respuesta humoral en el modelo murino (Clausse *et al.*, 2013). Esta vacuna recombinante BLSOmp31 también fue evaluada en perros, la cual fue formulada con un gel de hidróxido de aluminio (HA), y administrada por vía sub cutanea (s.c) (Clausse *et al.*, 2017). Sus resultados mostraron altos niveles de IgG hasta la semana 13 post vacunación. Luego, los niveles bajaron y permanecieron estables hasta la semana 45. La respuesta celular fue asociada una respuesta del tipo Th2, algo diferente a lo observado en modelo murino donde desarrollaron una respuesta Th1/Th2. Adicionalmente, esta vacuna indujo niveles de IgA e IgG en saliva, secreción prepuccial y lágrimas. Finalmente, los autores señalaron que la actividad bactericida del suero y la actividad opsonizante de los anticuerpos inducidos

por la vacuna podrían tener un rol protector en la etapa inicial de bacteremia, impidiendo el ingreso de *B. canis* en los tejidos blancos (Clausse *et al.*, 2017).

Estos resultados muestran el importante rol de la inmunidad de mucosas en la brucelosis canina, por ser la principal vía de contagio en perros.

Por otro lado, considerando que en países de medio oriente se ha detectado una elevada seroprevalencia de *B. canis* y *B. abortus*, donde incluso se han detectado perros con *B. abortus* y ganado bovino con *B. canis*, ha motivado el uso de la vacuna RB51 frente a *B. canis* en perros (Santos *et al.*, 2021, Hur *et al.*, 2010). La vacuna *B. abortus* cepa RB51 es usada para prevenir exitosamente la brucelosis bovina, la cual induce anticuerpos contra antígenos de *B. abortus*, incluidas sus proteínas de membrana externa y confiere protección contra la cepa virulenta *B. abortus* 2308 (Schuring *et al.*, 1991). Esta vacuna, ha sido probada en otros animales, incluidos búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), ovejas, cabras y bisontes, y ha sido utilizada para evaluar su protección frente a distintas especies de *Brucella* (Diptee *et al.*, 2006). Con la finalidad de mejorar su seguridad se han realizado modificaciones en diversos genes codificantes de factores virulencia de esta cepa bacteriana (Moriyón *et al.*, 2004, Olsen and Palmer. 2014). Se han evaluado parámetros humorales generados por la vacuna RB51 en ratones (Truong *et al.*, 2015) y en perros (Hur and Baek. 2017) frente a *B. canis* y *B. abortus*, concluyendo que la vacuna RB51, genera una respuesta

inmune heteróloga contra los antígenos de *B. canis*, siendo la respuesta inmune generada por RB51 mayor en ratones para antígenos de *B. canis* que para antígenos de *B. abortus* (Truong *et al.*, 2015). Sin embargo, en este estudio no pudieron concluir si la vacuna RB51 genera una respuesta inmune protectora contra *B. canis* asociada a participación de la inmunidad celular.

Debido a la ausencia de vacunas y de un programa de control para la brucelosis canina, se infiere que una rápida expansión de esta enfermedad produciría un fuerte impacto en la reproducción canina y en la Salud Pública (Borie *et al.*, 2022). Por lo anterior, es urgente analizar candidatos vacunales que consideren las características genómicas de las cepas circulantes a nivel mundial, toda vez que se ha comprobado su variabilidad genética, particularmente en genes asociados a factores de virulencia o proteínas de membrana externa (Borie *et al.*, 2021). Considerando que las especies del género *Brucella* presentan una elevada similitud antigénica, explicando la inmunidad cruzada generada frente a distintas especies, se infiere que se podrían utilizar candidatos vacunales basados en especies rugosas de *Brucella*, como la RB51, para inducir inmunidad heteróloga en las mucosas frente a *B. canis*. Por lo tanto, en este proyecto fue evaluado la respuesta inmune heteróloga inducida por la cepa *B. abortus* RB51 administrada por vía i.n. y con desafío en la mucosa genital con la cepa *B. canis* RM6/66 con el objetivo de generar protección en ratones BALB/c.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La inmunización intranasal con la vacuna *Brucella abortus* RB51 induce una respuesta inmune en la mucosa del tracto genital que protege sistémicamente a ratones BALB/c de la infección con *Brucella canis* RM6/66.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la inmunogenicidad y protección en el tracto genital de ratones BALB/c inmunizados con la vacuna RB51 frente a *Brucella canis*.

Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta inmune en la mucosa del tracto genital de ratones BALB/c inmunizados intranasalmente con la vacuna RB51.
2. Analizar los niveles de protección en la mucosa del tracto genital conferidos por la inmunización intranasal con la vacuna RB51 frente a la infección experimental con *B. canis*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales experimentales

Ratones hembras de 10 semanas de edad, de la línea isogénica BALB/c, fueron obtenidos del Instituto de Salud Pública (ISP) (Santiago, Chile). Los animales fueron mantenidos en las dependencias del Laboratorio de Inmunología Molecular (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción), separados aleatoriamente en grupos experimentales y controles, y aclimatados antes de comenzar los experimentos. Todos los ratones fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura, recibiendo alimento y agua *ad libitum*, y cumpliendo con todas las normas del Comité Bioético de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *Brucella abortus* RB51 y *Brucella canis* RM6/66. La cepa RB51 se cultivó en caldo Brucella (Difco) suplementado con 1 mg/ml de rifampicina (Duchefa Biochemie), mientras que la cepa RM6/66 se cultivó en caldo Brucella (Difco). Ambas fueron incubadas a 37 °C con agitación durante aproximadamente 48 horas, de acuerdo con cada experimento. Todos los procedimientos con bacterias vivas se realizaron en

instalaciones de bioseguridad nivel 2, siguiendo las normas establecidas por el Comité de Bioseguridad y Bioética de la Universidad de Concepción.

2.3 Extracción de proteínas totales de *Brucella*

Las proteínas totales de *B. canis* RM6/66 (Laboratorio de Inmunología, UdeC) y *B. abortus* RB51 (Laboratorio de Inmunología, UdeC) fueron obtenidas para evaluar la respuesta inmune de los animales inmunizados. Esta extracción fue desarrollada utilizando los protocolos descritos por Tabatabai, *et al.* (1994) y modificado por Oñate, *et al.* (2003). Para esto, las bacterias cosechadas fueron lavadas tres veces con PBS estéril (NaCl 136.8 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KCl 2.68 mM, pH 7.2) pH 7.2, y luego centrifugadas a 8000 x g (Centrifuga refrigerada H-2050R, HunanXiangYi Laboratory Instrument Developmed Co., Ltd, China) durante 10 min a 4°C. Las bacterias fueron inactivadas con metanol al 60% por 24 horas. Posterior a esto, las células fueron nuevamente lavadas y mantenidas por 24 horas a 4°C en solución salina hipertónica de NaCl 1 M, Citrato de Sodio 0.1 M y EDTA 0.5 mM (Sigma-Aldrich, Inc.). Posteriormente, las células fueron sonicadas (Ultrasonic Homogenizer, Serie 4710, Cole parmer, USA) durante 15 min a 60 watts, y centrifugadas a 8000g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado y almacenado con fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 0.2 mM (Sigma-Aldrich, Inc.). Las proteínas fueron concentradas con polietilenglicol 300 (Merck) en

bolsas de diálisis con capacidad de retención de pesos moleculares sobre 3500 (Dializer Tubing, Thomas Scientific, Philadelphia, USA). Luego, la fracción concentrada fue dializada contra agua destilada por dos días y centrifugadas a 9000g por 30 min a 4°C. Posteriormente las proteínas fueron cuantificadas usando el kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

2.4 Preparación de gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La visualización y detección de proteínas totales se realizó en geles de poliacrilamida montados en soporte BioRad (Miniprotean® 3 System). El gel SDS-PAGE consta de un gel separador y uno concentrador. El gel separador al 12% es preparado mezclando 2 ml de una solución de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 1.3 ml de tampón Tris pH 8.8, 50 ul de dodecilsulfato de Sodio (SDS, Winkler Ltda.) al 10% y 1600 ul de agua destilada. La polimerización se inició agregando 50 ul de persulfato de amonio y 2 ul de N,N,N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED, Sigma-Aldrich, Inc.). Sobre el gel separador polimerizado, se agregó el gel concentrador al 5%, el cual se preparó agregando 350 ul de la solución de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 250 ul de Tris-HCl pH 6.8, 20 ul de SDS al 10% y 1400 ul agua destilada. La polimerización fue obtenida agregando 20 ul de persulfato de amonio y 2 ul TEMED. Las muestras se cargan con Azul de Laemmli 5x y calentadas a 100°C durante 5 min. Al gel

se agrega un marcador de peso molecular para proteínas (protein ladder #SM0671, Fermentas, Life Science). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis BioRad (Miniprotean® 3 System) utilizando 1 litro de tampón de corrida (3,03 gr de Tris base, 14,41 gr de Glicina, 1 gr de SDS y 1 litro de agua destilada dejando la solución a pH 8,3) a temperatura ambiente y con un voltaje de 100 volt. Terminada la electroforesis, el gel fue desmontado del soporte BioRad (Miniprotean® 3 System) y fue teñido con una solución de azul de Coomasie (Sigma- Aldrich, Inc.) al 0.5% disuelto en 45% de metanol y 10 % ácido acético. Posteriormente el gel fue desteñido con una solución decolorante que contiene 10% de metanol y 10% ácido acético disuelto en H₂O destilada.

Diseño experimental para evaluar la respuesta inmune

El diseño experimental se describe brevemente en la Figura 3. La cepa *B. abortus* RB51 fue cultivada en caldo Brucella para su utilización en la inmunización de ratones BALB/c.

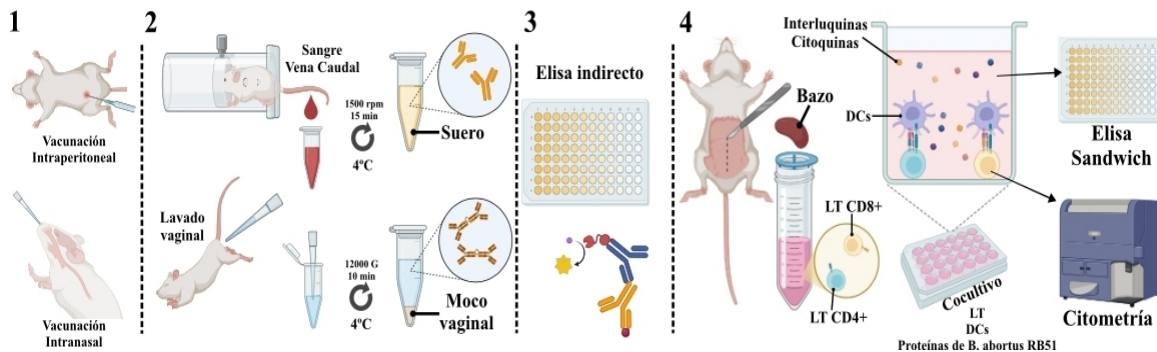


Figura 3: Diseño experimental del proceso de inmunización y evaluación inmune.

1) Inmunización con *B. abortus* RB51 por vía intraperitoneal o intranasal a los días 1 y 15 post-inmunización (p.i.); 2) Toma de muestras sanguíneas y de lavado vaginal en los días 0, 15, 30 y 45 p.i.; 3) Evaluación de la respuesta humoral mediante ELISA indirecto en suero y sobrenadante del moco vaginal, utilizando proteínas totales de *B. abortus* RB51 o de *B. canis* RM6/66; 4) En el día 45 p.i. se realiza la extracción del bazo para cultivo de esplenocitos con células dendríticas (DCs) sensibilizadas con proteínas totales de *B. canis*, seguido de 72 h de cultivo para analizar la proliferación de células antígeno específicas por citometría de Flujo. En paralelo, es evaluada la producción de citoquinas IL-4, IFN- γ y TNF- α en sobrenadante mediante ELISA sándwich.

2.5 Inmunizaciones

Ratones BALB/c fueron separados en grupos experimentales y controles (n=5). Los ratones experimentales fueron vacunados por ruta intraperitoneal (i.p.) o por ruta intranasal (i.n.) con *B. abortus* RB51, mientras que los grupos controles recibieron PBS por ruta i.p. o i.n. Posteriormente, estos animales fueron utilizados para evaluar la respuesta inmune humoral inducida por la vacunación; mientras que grupos similares (experimentales y controles) fueron utilizados para evaluar los niveles de protección conferidos mediante la vacuna *B. abortus* RB51 frente al desafío con *B. canis* RM6/66.

2.6 Producción de inmunoglobulinas

Los niveles de inmunoglobulinas M (IgM), IgG, IgG2a e IgA fueron evaluadas en los sueros derivados de sangre periférica obtenida por incisión de la vena caudal y en lavados vaginales a los días 0, 15, 30 y 45 p.i. mediante ELISA indirecto. Para ello, placas de poliestireno de 96 pocillos Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific Inc., MA USA) fueron sensibilizadas con 1 µg/ml de proteínas totales de *B. abortus* RB51 o *B. canis* RM6/66, e incubadas en cámara húmeda durante 16 h a 4°C. Pasado este tiempo, las placas fueron lavadas con buffer PBS-Tween-20 al 0,05% v/v, y a cada pocillo se le agregó PBS-Tween-20 al 0,05% con 0,8% de gelatina para bloquear sitios de unión inespecíficos, incubando por 1 h a 37°C. Posteriormente, fueron realizados tres lavados y se

agregaron los sueros o lavados vaginales (anticuerpos primarios) en diluciones seriadas, comenzando en 1:50. Las placas fueron incubadas por 3 h a temperatura ambiente. Tras nuevos lavados, se agregó el anticuerpo secundario mouse anti-IgM, IgA, IgG o IgG2a de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (US Biological, Life Sciences, MA USA) en dilución 1:1000. Las placas fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente. La reacción final fue revelada con 20 mg/ml de SigmaFast Ortofenildiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) y detenida con 50 μ L de H₂SO₄ 2N. Las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 490 nm en el lector de microplacas (Infinite M Nano, Tecan Group Ltd, Suiza). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.7 Ensayo bactericida del suero (SBA) adaptado a moco vaginal

Se emplearon muestras de moco vaginal obtenidas a los 45 días post inmunización de los grupos vacunados por vía i.p. e i.n. y control PBS. Para la obtención de proteínas del complemento se utilizó sangre de ratón, la cual se centrifugó a 1.500 rpm durante 15 minutos. El suero recuperado se mezcló con un volumen igual de buffer de lisis (Tris-HCl 0,605 g; NaCl 0,876 g; EDTA 0,0372 g, en 100 ml de agua destilada, ajustado a pH 7,4 con HCl) y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 15.000 rpm por 20 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C en presencia de inhibidores de proteasas hasta su uso.

El moco vaginal se sometió a diluciones seriadas (sin diluir, 1:50, 1:100, 1:150 y 1:200) utilizando buffer Hank's suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} (NaCl 0,8 g; KCl 0,04 g; KH_2PO_4 0,006 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,048 g; glucosa 0,1 g; CaCl_2 0,0147 g; MgCl_2 0,0102 g en 100 ml de agua destilada). El complemento se adicionó en una proporción equivalente al 20% del volumen final.

La cepa *Brucella canis* RM6/66 se ajustó a una concentración de 10 UFC/ μl y se incubó durante 1 hora a 37 °C en presencia de las diferentes condiciones experimentales. Para cada grupo de inmunización se consideró la incubación de bacterias con moco vaginal únicamente, con moco vaginal y complemento, y con moco vaginal más complemento inactivado por calor (56 °C durante 30 minutos).

Posteriormente, las mezclas se sembraron en agar sangre mediante la técnica de microgota y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. Al finalizar el periodo de incubación, se realizó el conteo de las colonias bacterianas formadas y los resultados se expresaron como UFC/ml.

2.8 Estudio de linfoproliferación de esplenocitos por citometría de flujo

La proliferación de linfocitos antígenos específicos inducidas por la vacunación fue evaluada en los esplenocitos de los ratones inmunizados y controles utilizando Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen) y analizadas por citometria de flujo (BD

LSRFortessa™X-20 Cell, BD Biosciences, CA, EE. UU.). Estas suspensiones celulares fueron obtenidas a partir del bazo mediante disgregación usando cell strainer de 70 µm. Las células fueron lavadas tres veces con PBS y los “pellets” fueron resuspendidos en tampón de lisis de glóbulos rojos (NH₄Cl 155 mM; KHCO₃ 10 mM y EDTA 0,1 mM), e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Las células fueron nuevamente lavadas y contadas usando el método de exclusión de azul de tripano y ajustadas a 4 x 10⁶ células viables/ml usando una cámara de Neubauer. En paralelo, células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) fueron obtenidas desde el femur y tibias de ratones BALB/c. Estas células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementada con GM-CSF 20 ng/mL e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. A los 3 días se realizó un cambio de medio con GM-CSF fresco (20 ng/mL). En el día 7, las células fueron cargadas con antígenos y co-cultivadas con los esplenocitos para el análisis de proliferación de linfocitos T y la medición de citoquinas (Sauter *et al.*, 2022). Los análisis fueron realizados en BD LSRFortessa™ X-20 Cell (BD Biosciences, CA, EE. UU.), equipada con tres láseres: 488 nm, 640 nm y 405 nm. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

2.9 Producción de citoquinas

Los niveles de citoquinas IFN- γ , TNF- α e IL-4 fueron evaluados desde el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos obtenidos en 2.6, a partir de la

disgregación del bazo de ratones inmunizados y no inmunizados. Estas células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos Nuncion Delta (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), previamente sensibilizadas con 1, 5 o 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas totales de RB51, y se incubaron durante 72 h a 37°C con 5% CO_2 . Finalizado este periodo, las placas fueron centrifugadas a 400 x g (Universal 32R, A. Hettich GmbH & Co. KG. Alemania) por 10 min a 4°C , y se procedió a recolectar el sobrenadante, a partir del cual se realizaron las mediciones de IFN- γ , TNF- α e IL-4 mediante ELISA sándwich. Estos ensayos fueron realizados utilizando los kits comerciales Ready-SET-Go! mouse IFN- γ , TNF- α e IL-4 (eBioscience, San Diego, CA). La concentración de las citoquinas presentes en el sobrenadante fue calculada mediante una regresión lineal basada en los valores de absorbancia obtenidos a partir de las curvas estándar de las citoquinas recombinantes (eBioscience, San Diego, CA). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Diseño experimental para evaluar la protección frente a infección.

La cepa *B. abortus* RB51 y *B. canis* RM6/66 fueron cultivadas en caldo Brucella y utilizadas para desarrollar los experimentos que se describen brevemente en la **Figura 4**.

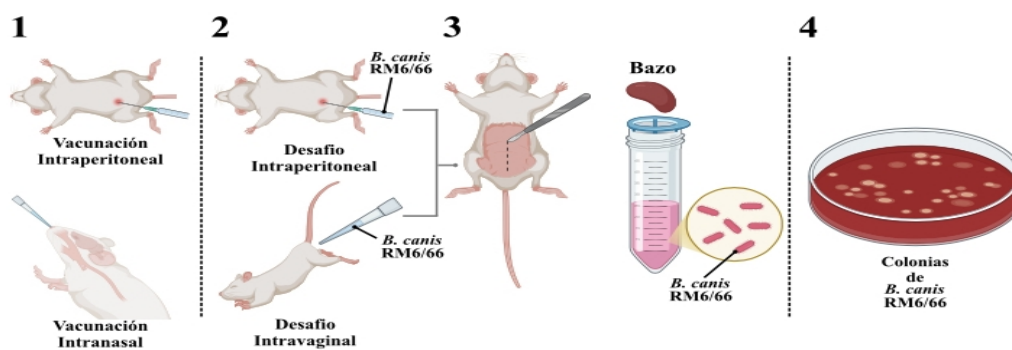


Figura 4: Diseño experimental para ensayos de protección.

1) Inmunización de *B. abortus* RB51 por vía intraperitoneal o intranasal a los días 1 y 15; 2) Desafío con *B. canis* RM6/66 por vía intraperitoneal o intravaginal a los 15 días después de la última inmunización. 3) Extracción del bazo a los 15 días del desafío, y cultivo de esplenocitos con técnica de microgota en agar sangre; 4) Recuento de colonias de *B. canis* RM6/66 a las 72 horas de cultivo, para el cálculo del índice de protección.

2.10 Ensayos de protección

La capacidad protectora de la vacuna RB51 administrada i.n. fue evaluada desafiando a los ratones i.v. con $2,8 \times 10^5$ UFC de la cepa patógena RM6/66 o por vía i.p. con similar número de UFC/ml. Pasado dos semanas de la infección, los ratones fueron eutanasiados para extraer el bazo, un órgano que fue homogenizado en PBS, con el cual se procedió a desarrollar diluciones seriadas. Estas diluciones fueron sembradas en microgotas sobre placas Petri con agar Columbia suplementado con 5% de sangre de cordero (bioMérieux Chile, Santiago, Chile) a 37°C durante 72 h. Posteriormente, se realizó el recuento de UFC de RM6/66 por bazo. El índice de protección (unidades de protección) fue presentado como la diferencia entre el promedio del logaritmo de UFC por bazo del control negativo (PBS) y el promedio del logaritmo de UFC en el bazo del grupo experimental.

2.11 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos con los anticuerpos, niveles de citoquinas y linfoproliferación fueron analizados mediante ANOVA de dos vías y un post-test de Bonferroni. Los resultados obtenidos en los ensayos de protección, SBA y AUC fueron analizados mediante un ANOVA de una vía. Todos los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 9. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Detección de las proteínas totales

En la Figura 5 se muestran las proteínas totales extraídas desde *Brucella abortus* RB51 y *Brucella canis* RM6/66, visualizadas mediante SDS-PAGE al 12%. El gel revela un patrón escalonado característico, con bandas distribuidas en distintos pesos moleculares, lo que confirma la correcta extracción y preservación de las fracciones proteicas de ambas cepas. Esta verificación respalda la integridad de las proteínas derivadas de estas cepas para su uso como antígenos en la evaluación inmune.

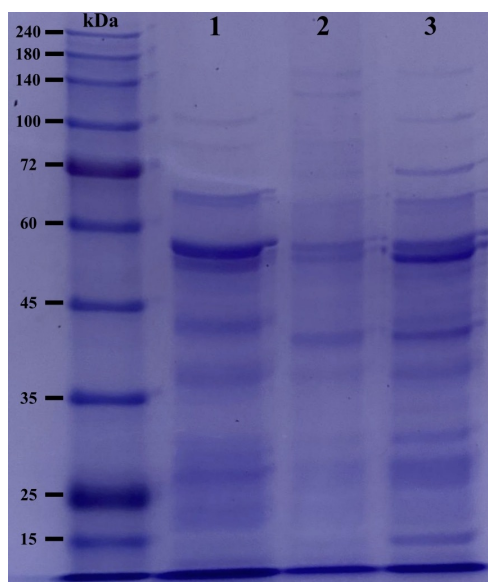


Figura 5: Detección de proteínas totales de las cepas RB51 y RM6/66 por SDS-PAGE. kDa marcador de peso molecular; 1. Proteínas totales de *B. abortus* RB51; 2. Proteínas en el extracto del lisado de *B. canis* RM6/66, 3. Proteínas totales de *B. canis* RM6/66.

3.2 Evaluación de la respuesta inmune

3.2.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral

Los niveles de inmunoglobulinas en suero de ratones inmunizados por vía i.p. o i.n. frente a proteínas totales de RB51 o RM6/66 fueron analizados mediante ELISA. Los resultados muestran que los títulos de IgM anti- proteínas totales de RB51 generados por la vacunación i.p. fueron significativamente mayores ($*P < 0,05$) que los generados por la vía i.n. en los días 15, 30 y 45 p.i. Estas diferencias también fueron observadas al comparar el grupo de ratones inmunizados por vía i.p. con el grupo control PBS en los días 15 (1:100), 30 (1:100) y 45 (1:300) p.i (Figura 6A). Por otro lado, la producción de IgM anti-antígenos de RM6/66 en el grupo inmunizado por vía i.p. fueron significativamente mayores que el grupo inmunizado i.n. y que el grupo PBS durante todo el experimento (Figura 6B). El análisis cuantitativo del área bajo la curva (AUC) en las Figuras 6C y 6D muestra que la vía i.p. genera valores significativamente elevados en los animales inmunizados frente a antígenos de RB51 y RM6/66, con diferencias significativas frente al control ($****P < 0,0001$). La vía i.n. generó diferencias en el AUC frente a los antígenos de RB51 ($*P < 0,05$) y nulos para los antígenos de RM6/66, respecto a sus controles.

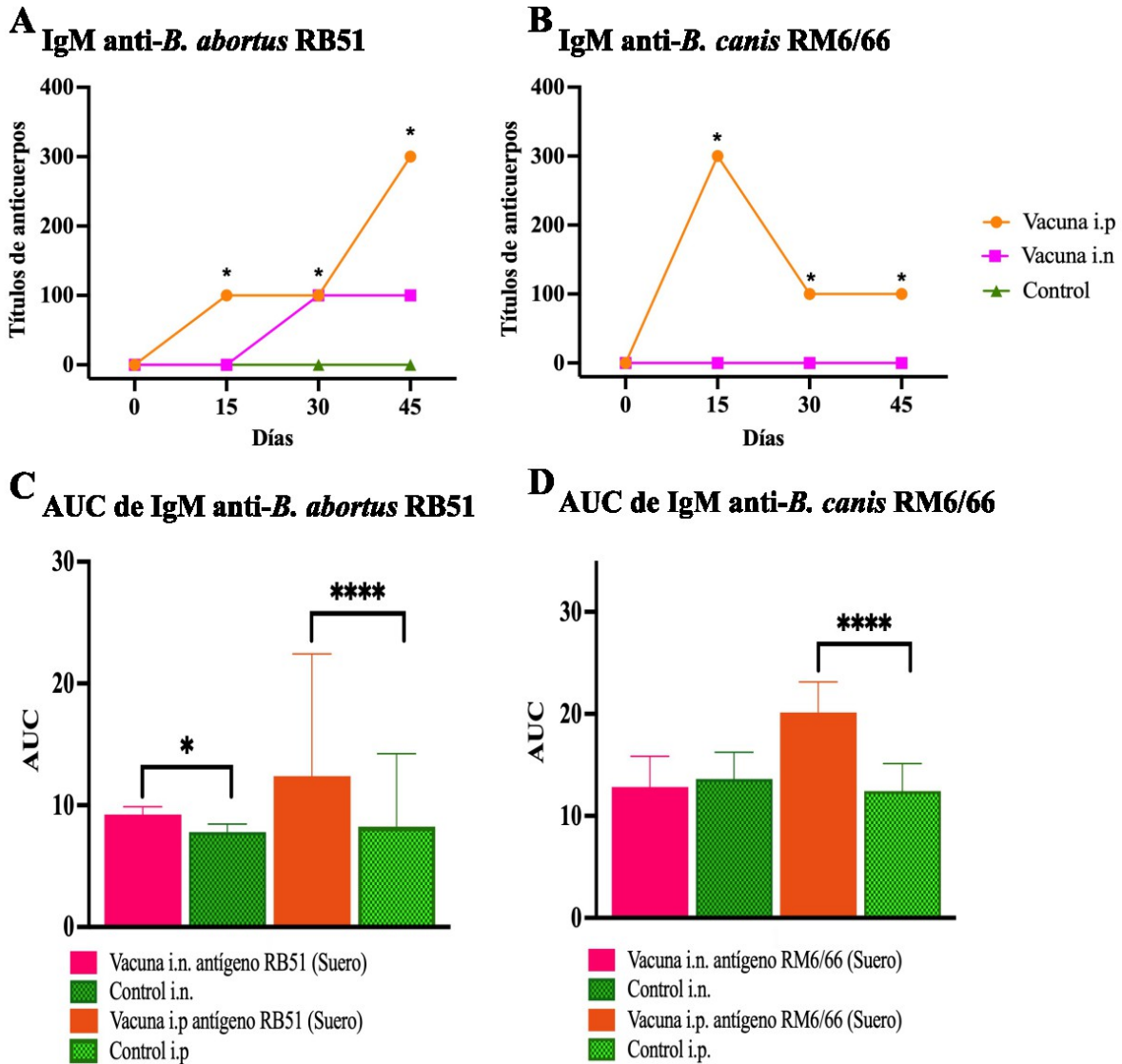


Figura 6: Respuesta de anticuerpos IgM en suero.

A) Niveles de IgM frente a antígenos de *B. abortus* RB51; B) Niveles de IgM frente a antígenos de *B. canis* RM6/66; C) Área bajo de la curva (AUC) de IgM anti-RB51, D) Área bajo de la curva (AUC) de IgM anti-RM6/66. Las barras de error representan la desviación estándar (n=2). Los valores resaltados indican diferencias significativas (*P < 0.05 y ****P < 0.0001).

Los niveles de IgG en suero frente a proteínas totales de RB51 o RM6/66 en ratones inmunizados por vía i.p. e i.n. fueron analizados. Los resultados muestran que la inmunización por vía i.p. indujo títulos de IgG frente a antígenos de RB51 significativamente mayores que los títulos inducidos por la i.n. en los días 30 y 45 ($\delta P < 0.05$) y que el grupo control en los días 15 (1:100), 30 (1:900) y 45 (1:900) p.i. ($*P < 0.05$). El grupo inmunizado i.n. alcanzó títulos de 1:100 en los días 30 y 45 (Figura 7A). Por otro lado, el incremento de IgG frente a antígenos de RM6/66 fue incrementado significativamente en los animales inmunizados por vía i.p. con los grupos inmunizados i.n. y grupo PBS a los días 15 (1:100), 30 (1:900) y 45 (1:900) ($*P < 0.05$). En el grupo inmunizado por vía i.n. se observó un leve aumento a partir del día 30, con títulos de 1:100 mantenidos hasta el día 45 (Figura 7B). Los valores de AUC para IgG frente a antígenos de ambas cepas muestra que la inmunización i.p. generó una respuesta significativamente mayor ($****P < 0,0001$) en comparación con sus controles, la inmunización i.n. generó una respuesta significativa ($*P < 0,05$) en comparación con sus controles para ambos antígenos (Figura 7C y 7D).

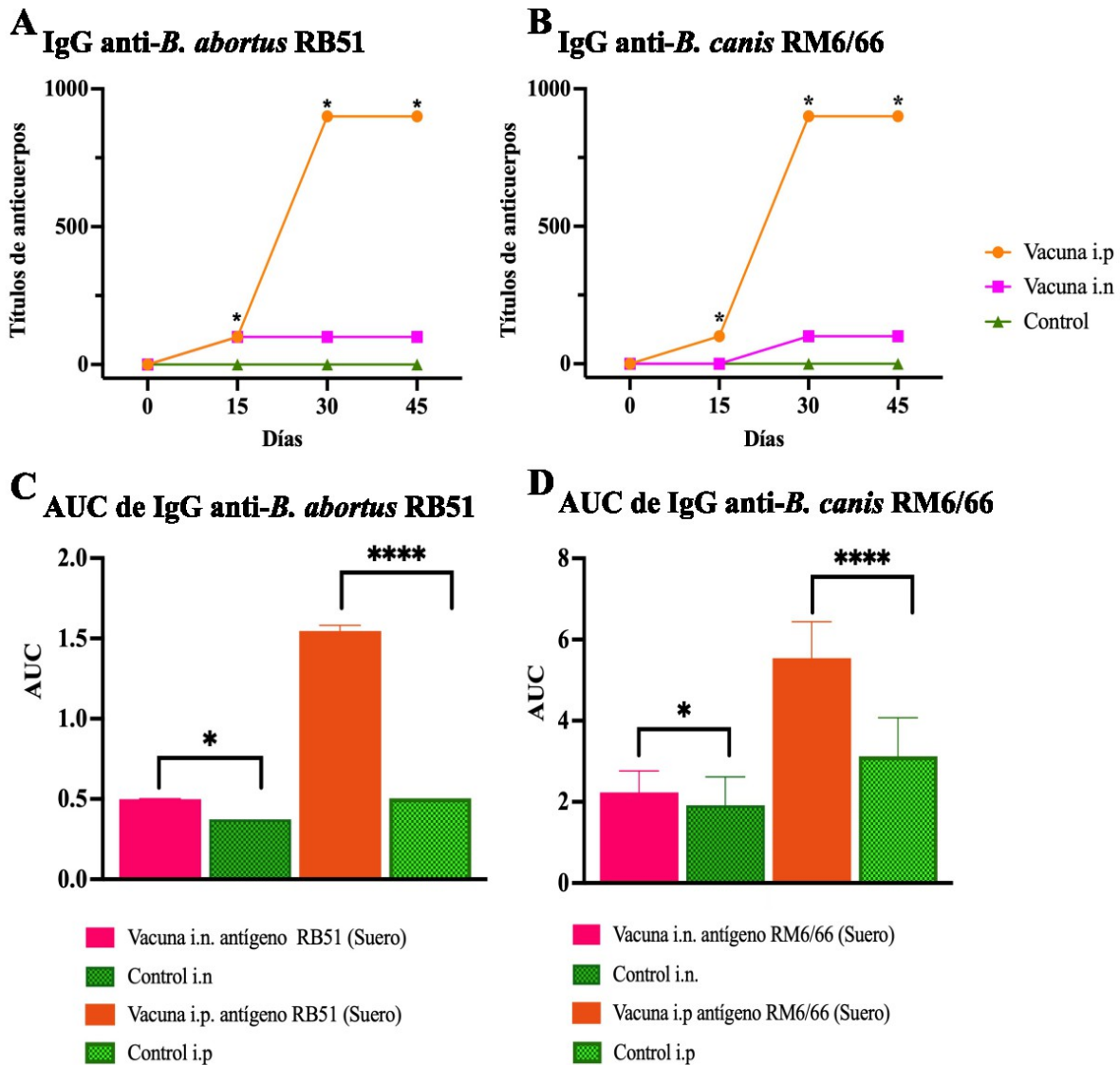


Figura 7: Respuesta de anticuerpos IgG en suero.

A) Niveles de IgG inducidos por antígenos de *B. abortus* RB51. B) Niveles de IgG inducidos por antígenos de *B. canis* RM6/66. C) Área bajo de la curva (AUC) de IgG anti-RB51, D) Área bajo de la curva (AUC) de IgG anti-RM6/66. Las barras de error representan la desviación estándar (n=2). Los valores resaltados indican diferencias significativas (* $P < 0.05$ y **** $P < 0.0001$).

Los niveles de IgG2a en suero frente a proteínas totales de RB51 o RM6/66 en ratones inmunizados por vía i.p. e i.n. fueron analizados. Los resultados muestran que la inmunización i.p. frente a los antígenos de RB51 indujo títulos significativamente mayores de IgG2a que los grupos inmunizados i.n. y control PBS en todos los días 15 (1:300), 30 (1:2700) y 45 (1:2700) (*P<0,05) (Figura 8A). Por otro lado, la inmunización i.p. indujo niveles significativos de IgG2a frente a antígenos de RM6/66 comparados con los grupos inmunizados i.n. y grupo PBS en los días 15 (1:100), 30 (1:900) y 45 (1:2700) (*P<0,05) (Figura 8B). En el grupo i.n., solo se observó una respuesta detectable a partir del día 30, con títulos de 1:100 mantenidos hasta el día 45. Los valores de AUC de IgG2a (Figura 8C y 8D) frente a ambos antígenos mostró que la inmunización i.p. indujo una respuesta significativamente mayor (****P<0,0001) en comparación con sus controles. En contraste, la inmunización i.n. produjo respuesta significativa (**P=0,003) solo para los antígenos de RB51 en comparación con su control.

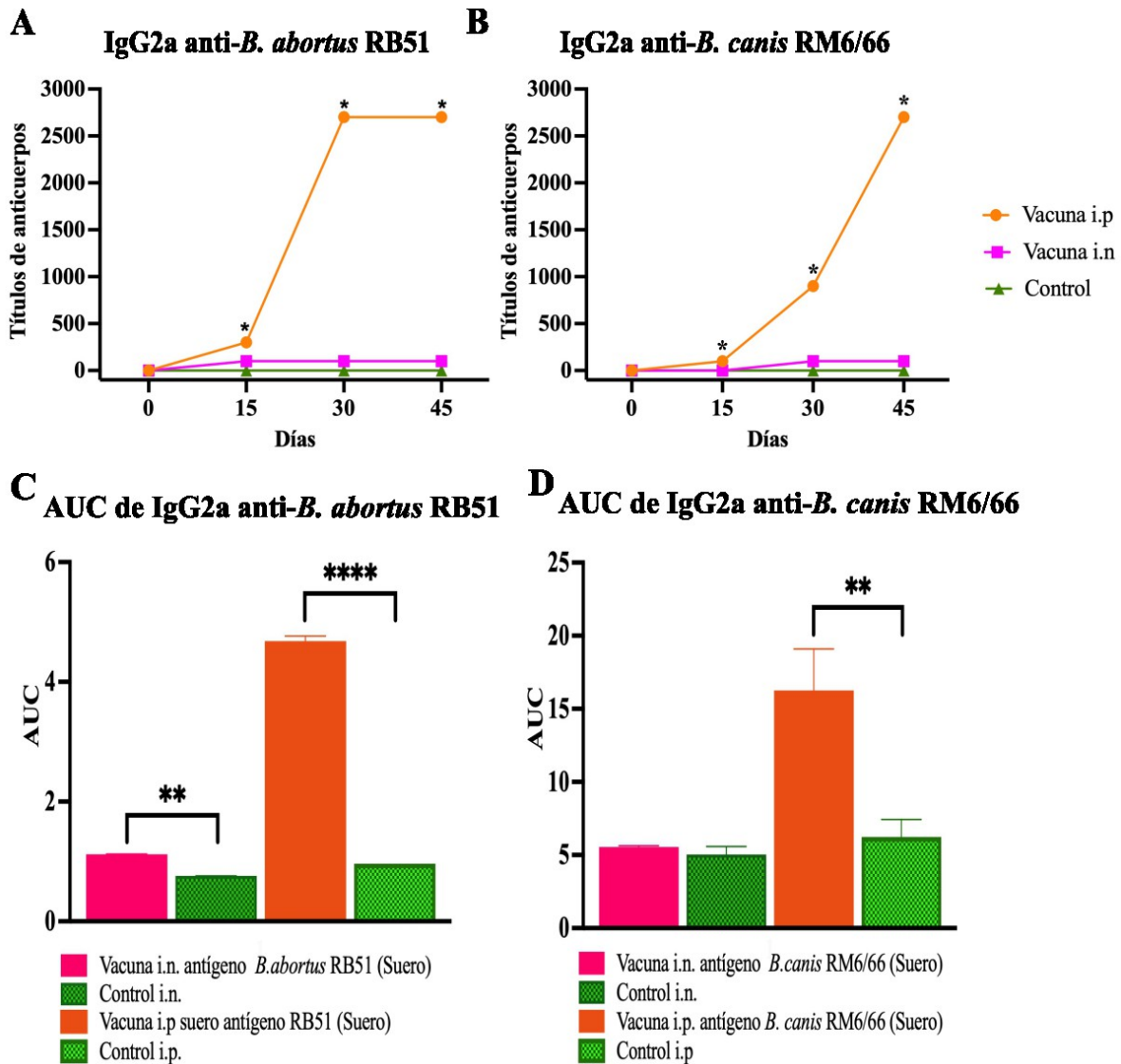


Figura 8: Respuesta de anticuerpos IgG2a en suero.

A) Niveles de IgG2a inducidos por antígenos de *B. abortus* RB51. B) Niveles de IgG2a inducidos por antígenos de *B. canis* RM6/66. C) Área bajo de la curva (AUC) de IgG2a anti-RB51, D) Área bajo de la curva (AUC) de IgG2a anti-RM6/66. Las barras de error representan la desviación estándar (n=2). Los valores resaltados indican diferencias significativas (*P < 0.05, **P = 0,003 y ****P < 0.0001).

Los niveles de IgA en suero frente a proteínas totales de RB51 o RM6/66 en ratones inmunizados por vía i.p. e i.n. fueron analizados. Los resultados muestran que la inmunización por vía i.n. indujo títulos significativamente mayores de IgA frente a antígenos de RB51 que los observados en el grupo control y por vía i.p. en los días 15 (1:100), 30 (1:100) y 45 (1:300) p.i. (*P < 0,05) (Figura 9A). En cuanto a la respuesta frente a antígenos de RM6/66 (Figura 9B), la inmunización i.n. generó títulos de IgA significativamente superiores a los del grupo PBS en los días 30 (1:300) y 45 (1:300) (*P < 0,05). Al comparar ambas vías, el grupo inmunizado por vía i.n. mostró títulos significativamente más altos que el grupo i.p. al día 30 ($\delta P < 0,05$). El grupo i.p. presentó una respuesta más tardía, con títulos de 1:100 en el día 30 y 1:300 en el día 45, equiparándose a los niveles de la vía i.n. al final del periodo experimental. El AUC de IgA (Figura 9C y 9D) evidenció que la inmunización i.n. indujo una respuesta significativamente mayor para antígenos de RB51 (**P = 0.003) y para RM6/66 (*P < 0,05). La inmunización por vía i.p. mostró una diferencia significativa frente a RB51 y a RM6/66 (*P < 0,05) con sus respectivos controles.

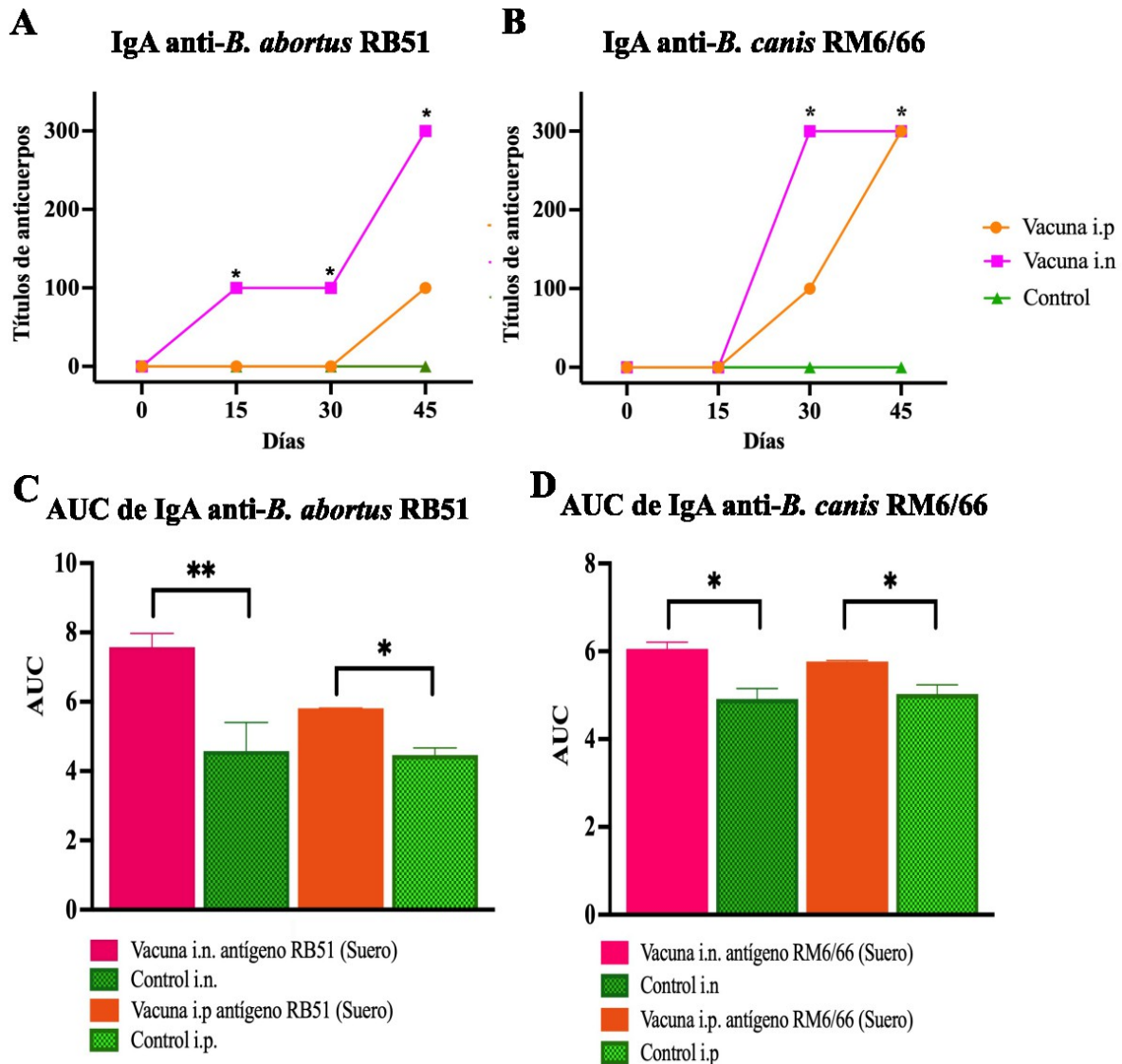


Figura 9: Respuesta de anticuerpos IgA en suero.

A) Niveles de IgA inducidos por antígenos de *B. abortus* RB51. B) Niveles de IgA inducidos por antígenos de *B. canis* RM6/66. C) Área bajo de la curva (AUC) de IgA anti-RB51, D) Área bajo de la curva (AUC) de IgA anti-RM6/66. Las barras de error representan la desviación estándar (n=2). Los valores resaltados indican diferencias significativas (* $P < 0.05$ y ** $P = 0,003$).

Los niveles de IgA en moco vaginal frente a proteínas totales de RB51 o RM6/66 en ratones inmunizados por vía i.p. o i.n fueron analizados. En la Figura 10A, se observan los títulos de IgA frente al antígeno RB51. La inmunización por vía i.p. e i.n generaron títulos significativamente superiores a los del grupo PBS en los días 30 y 45 (1:100; 1:75) respectivamente (*P < 0,05). En cuanto a la respuesta frente a antígenos de RM6/66 (Figura 10B), la inmunización i.n. generó títulos de IgA significativamente más altos que el grupo PBS en los días 15 (1:50), 30 (1:50) y 45 (1:150) (*P < 0,05). Al comparar con la vía i.p., se observaron títulos significativamente mayores en el grupo inmunizado por vía i.n. en los días 15 y 45 (δ P < 0,05). En contraste, la inmunización i.p. indujo una respuesta débil y transitoria frente a RM6/66, alcanzando un título de 1:50 al día 30, decayendo a niveles no detectables al día 45. En el AUC de IgA en moco vaginal frente a ambos antígenos (Figura 10C y 10D), la inmunización i.n. produjo una diferencia significativa para RB51 (**P = 0,0063) y para RM6/66 (****P < 0.0001) con sus controles. Por otro lado, la inmunización i.p. generó una respuesta IgA solo a RB51 (*P < 0,05) con su control.

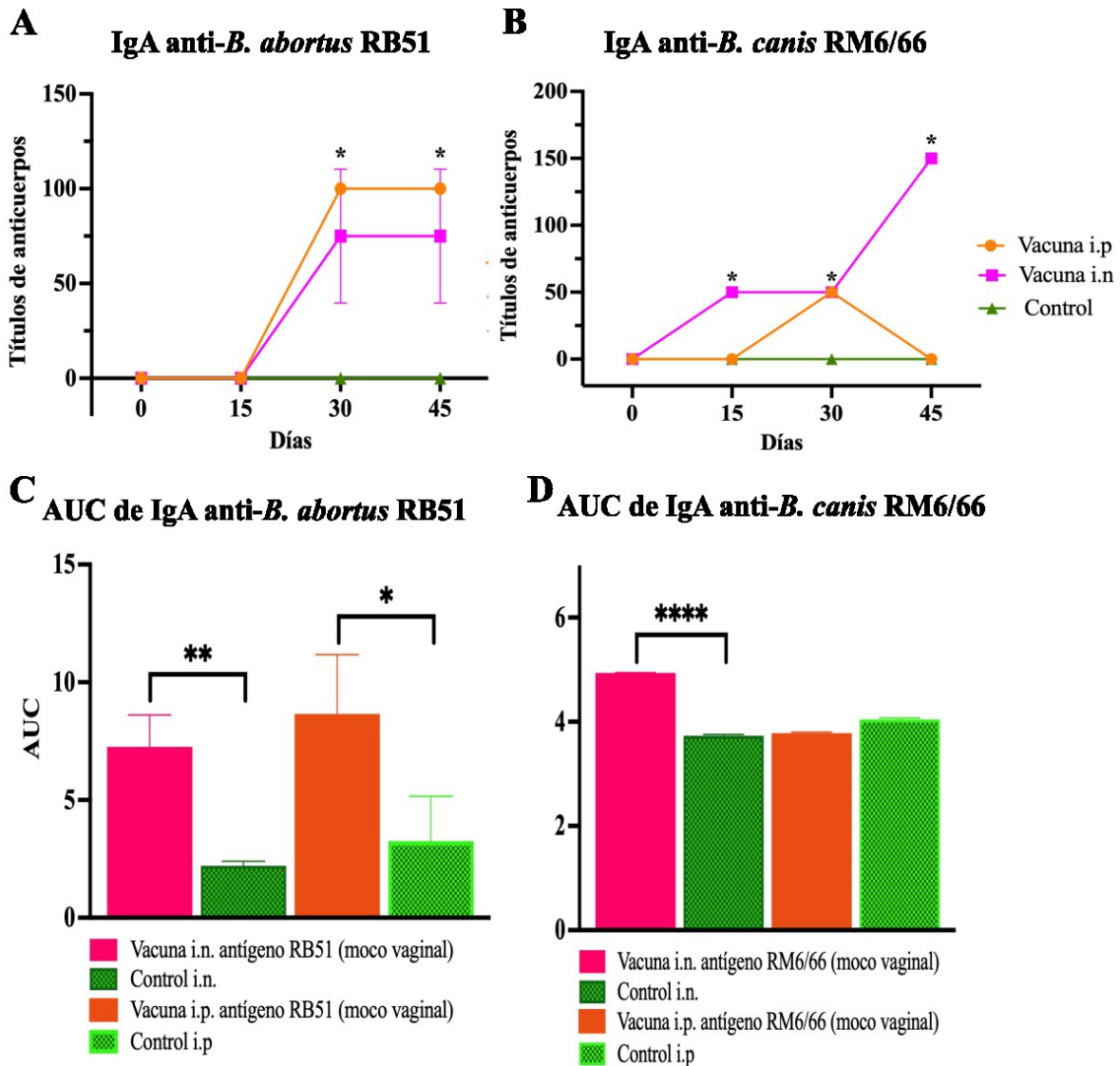


Figura 10: Respuesta de anticuerpos IgA en moco vaginal.

A) Niveles de IgA inducidos por antígenos de *B. abortus* RB51. B) Niveles de IgA inducidos por antígenos de *B. canis* RM6/66. C) Área bajo de la curva (AUC) de IgA anti-RB51, D) Área bajo de la curva (AUC) de IgA anti-RM6/66. Las barras de error representan la desviación estándar (n=2). Los valores resaltados indican diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P = 0,0063$ y **** $P < 0,0001$).

3.2.2 Evaluación de vaginal SBA

Se evaluó la funcionalidad de las inmunoglobulinas presentes en el moco vaginal de ratones inmunizados con RB51 a los 45 días p.i. frente a *B. canis* RM6/66 mediante un ensayo bactericida adaptado (SBA). En la Figura 11A, tanto la vacunación i.p. como i.n. impidieron el crecimiento bacteriano, evidenciado por la ausencia de UFC, mientras que el control mostró en promedio 1×10^4 UFC/ml, significativamente mayor (**P = 0.0009). En la Figura 11B, con el complemento inactivado, los grupos i.p. no presentaron crecimiento, mientras que la vacunación i.n. mostró en promedio 5×10^1 UFC/ml. El control presentó 1.8×10^3 UFC/ml, significativamente superior (****P < 0.0001). En la Figura 11C, la adición de proteínas del complemento mantuvo este efecto, sin formación de colonias en los grupos vacunados, en contraste con el control que alcanzó 5×10^4 UFC/ml (****P < 0.0001).

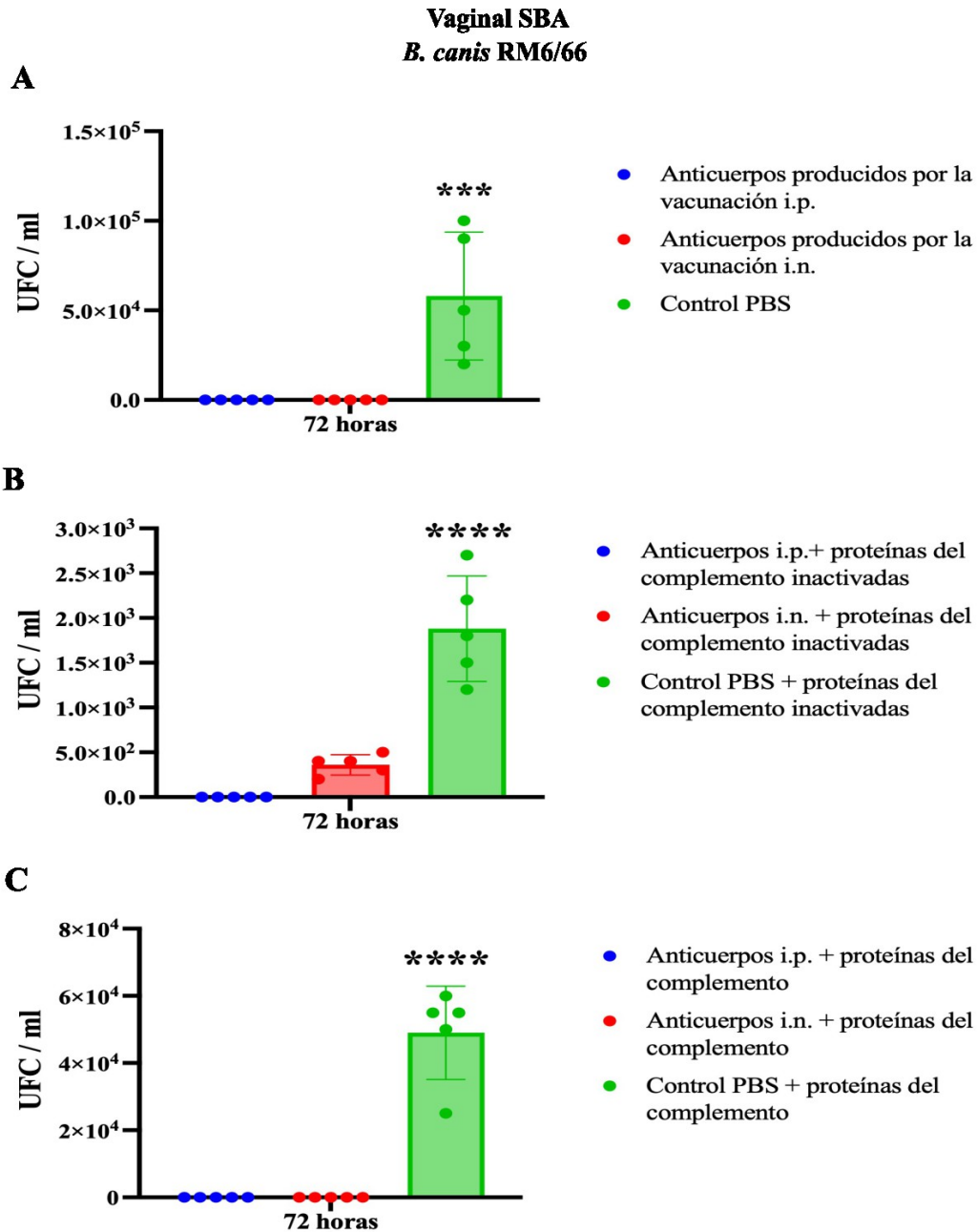


Figura 11: Ensayo bactericida del suero (SBA) adaptado a moco vaginal

A) UFC/ml RM6/66 expuestos a anticuerpos presentes en moco vaginal inducidos por vacunación i.p. e i.n. B) UFC/ml RM6/66 expuestos a anticuerpos en presencia de proteínas del complemento inactivado. C) UFC/ml RM6/66 expuestos a los mismos anticuerpos en presencia de proteínas del complemento. Los valores resaltados indican diferencias significativas (**P = 0.0009 y ****P < 0.0001).

3.2.3 Detección de citoquinas y linfoproliferación

Para determinar el perfil de citocinas inducido por la vacunación con *B. abortus* RB51 fueron estimuladas células esplénicas de ratones inmunizados por vía i.p. o por vía i.n. con proteínas totales de *B. canis* RM6/66 (1, 5 y 10 µg/ml) durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron analizados para cuantificar IFN- γ , TNF- α e IL-4. En la Figura 12A, fueron evaluadas las tres concentraciones de antígeno para determinar cuál inducía una producción significativa de IFN- γ . En el grupo inmunizado por vía i.n. la estimulación con 10 µg/ml generó una respuesta robusta, alcanzando 3451 pg/ml, con niveles similares al control positivo (Concavalina A). Estos valores fueron significativamente superiores al control negativo (RPMI) y al grupo PBS, lo que sugiere una activación efectiva de la respuesta Th1. En cambio, las concentraciones de 1 y 5 µg/ml no generaron un incremento significativo comparado con el grupo PBS. Por otro lado, en el grupo inmunizado por vía i.p., la estimulación con 10 µg/ml produjo niveles de IFN- γ inferiores a los observados con Concavalina A y similares al control con PBS, lo que sugiere una activación débil o ausente frente al antígeno en estas condiciones. En la Figura 12B, se evaluó la producción de TNF- α en cultivos esplénicos estimulados con proteínas totales de *B. abortus* RB51. En el grupo inmunizado por vía i.n., solo la concentración de 10 µg/ml generó una respuesta

significativamente mayor que el grupo control PBS, alcanzando 1041 pg/ml. Las concentraciones de 1 y 5 µg/ml no difirieron del control. En este contexto, la Concavalina A no representa un control relevante, ya que no induce altos niveles de TNF- α *in vitro*. Por otro lado, en el grupo inmunizado por vía i.p., los niveles de TNF- α fueron similares al control PBS en todas las concentraciones evaluadas, lo que sugiere una activación deficiente de esta citocina mediante esta vía de inmunización. En cuanto a IL-4 (Figura 12C), no se detectó producción relevante en ninguno de los grupos experimentales. En todos los casos, los niveles fueron 0,05 pg/ml con 1 µg/ml de antígeno y 0 pg/ml con 5 y 10 µg/ml, sin diferencias entre las vías de inmunización. En resumen, la vacunación con *B. abortus* RB51, especialmente por vía intranasal, indujo una respuesta tipo Th1 marcada por la producción de IFN- γ y TNF- α en células esplénicas estimuladas, sin activación significativa de la vía Th2 (IL-4). Estos resultados refuerzan el perfil inmunológico deseado para el control de *Brucella* spp., y destacan el potencial inmunoestimulador de la vía i.n.

En el caso de los resultados de la linfoproliferación en bazo no son mostrados por no haber diferencias los grupos tratados con sus controles.

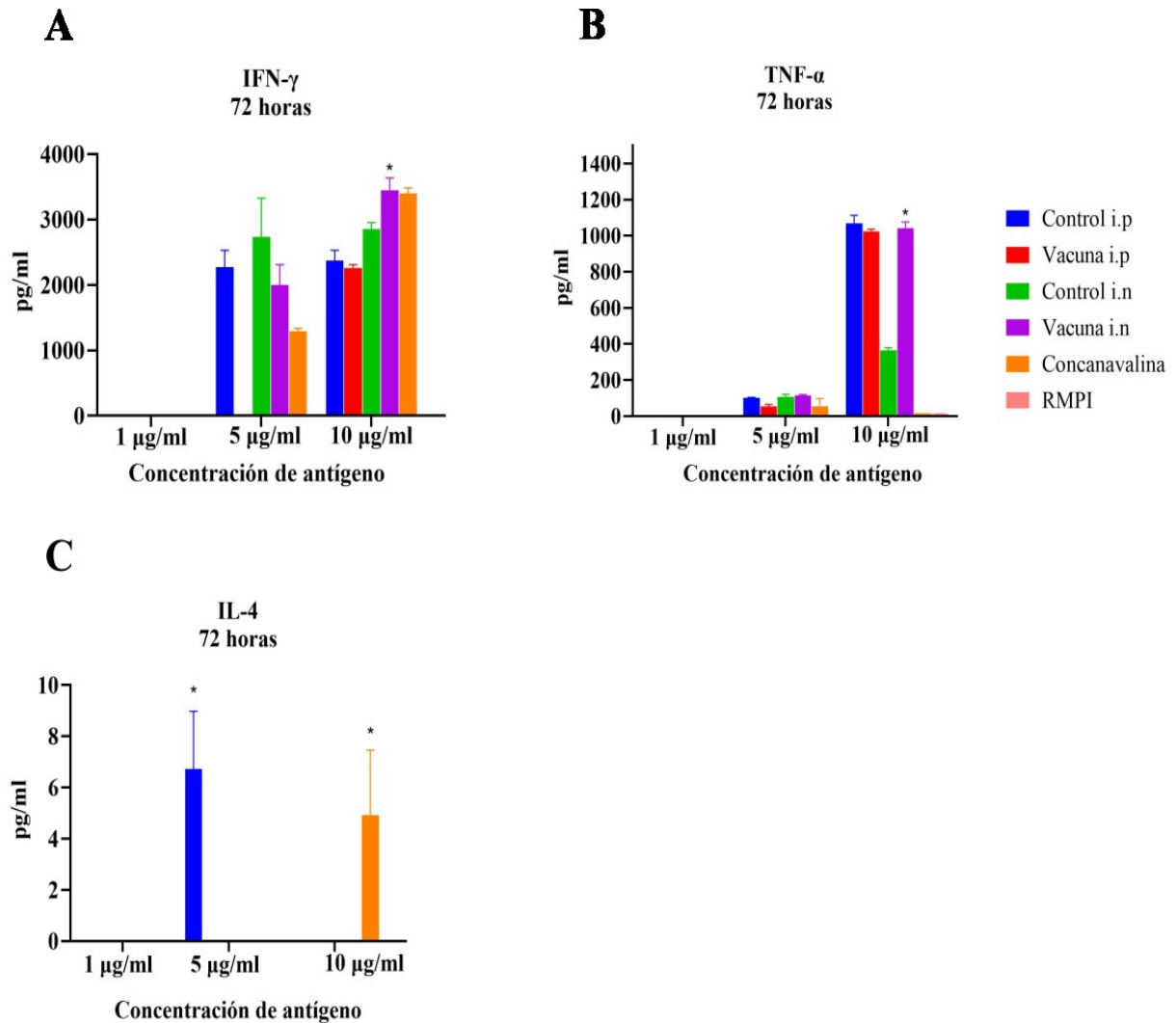


Figura 12: Secreción de citoquinas por linfocitos estimulados *in vitro*.

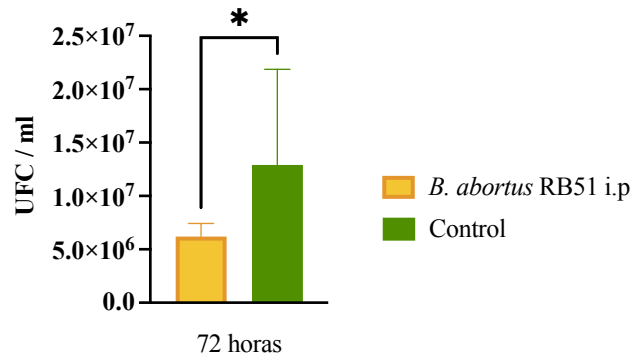
A) Niveles de IFN- γ , B) TNF- α y C) IL-4 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos de bazo de ratones BALB/c inmunizados con *B. abortus* RB51 por vía i.p. o i.n.. Las células fueron estimuladas con células dendríticas (DCs) y proteínas totales de RB51 a concentraciones de 1, 5 y 10 μ g/ml. Las citoquinas fueron cuantificadas mediante ELISA tipo sándwich. Las barras de error representan la desviación estándar (n=2). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (*P < 0,05) respecto a sus respectivos controles (PBS, Concanavalina A y RPMI). Los resultados se expresan en pg/ml.

3.3 Ensayo de protección

Ratones BALB/c inmunizados con la cepa RB51 por vía i.p. o i.n. a los días 1 y 15, fueron desafiados 15 días posterior a la última inmunización con *B. canis* RM6/66 por vía intraperitoneal o intravaginal (i.v.). 15 días post infección fue extraído y disgregado el bazo de cada animal, y cultivados mediante la técnica de microgotas en agar sangre. Se contó el número de colonias de *B. canis* RM6/66 a las 72 horas de cultivo en los diferentes grupos experimentales y sus respectivos controles para calcular el índice de protección. En la Figura 13A se muestra el recuento de *B. canis* RM6/66 en bazo disgregado de los ratones inmunizados por vía i.p. frente al grupo control que recibió PBS por la misma vía. El grupo control presentó un recuento promedio de $1,3 \times 10^7$ UFC/mL, mientras que el grupo inmunizado mostró $6,2 \times 10^6$ UFC/mL, resultando en una diferencia estadísticamente significativa (*P < 0,05). De igual forma, en la Figura 13B se observa el recuento de *B. canis* RM6/66 en bazo disgregado del grupo inmunizado por vía i.n. en comparación con su respectivo grupo control (PBS i.n.). El grupo control tuvo un promedio de $3,4 \times 10^3$ UFC/mL, en contraste con el grupo inmunizado en el cual no fueron observadas UFC/mL, diferencia que también fue estadísticamente significativa (****P < 0,0001)

A

Recuento de *B. canis* RM6/66 en bazo con vacunación i.p.



B

Recuento de *B. canis* RM6/66 en bazo con vacunación i.n.

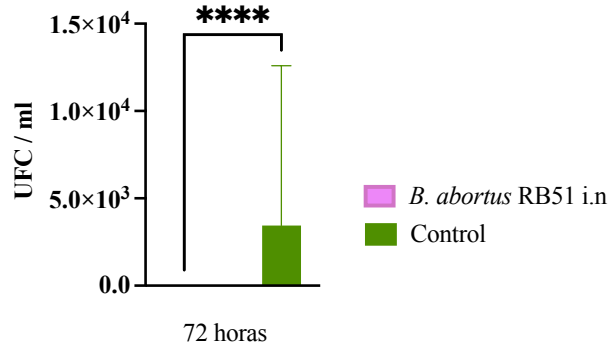


Figura 13: Recuento de colonias de cepa RM6/66 en bazo.

A) Recuento de colonias de *B. canis* RM6/66 (expresado en UFC/ml) en el grupo inmunizado por vía i.p. versus el grupo control que recibió PBS y fue desafiado por vía i.p. con *B. canis* RM6/66. B) Recuento de colonias de *B. canis* RM6/66 (expresado en UFC/ml) en el grupo inmunizado por vía i.n. versus el grupo control que recibió PBS y fue desafiado por vía i.v. con *B. canis* RM6/66. Los valores resaltados indican diferencias significativas (*P < 0,05) en comparación con su control PBS.

La **Tabla 1** muestra los índices de protección obtenidos por la inmunización por vía i.p. y por vía i.n, la cual indujo un nivel de protección de 0,319 \log_{10} en los animales desafiados por vía intraperitoneal, mientras que la inmunización i.n. y el desafío por vía i.v. indujo un nivel de protección, de 2,13 \log_{10} .

Tabla 1. Ensayo de protección.

Resultado contra el desafío con la cepa RM6/66 de *Brucella canis*, de ratones BALB/c inmunizados con la cepa RB51 de *Brucella abortus*.

Dosis 1 ^{era} vacuna UFC/ratón	Dosis 2 ^{da} vacuna UFC/ratón	Vía de vacunación	Dosis infectante UFC/ratón	Vía de infección	Semanas de desafío	Índice de protección
<i>B. abortus</i> RB51 1x10 ⁸	<i>B. abortus</i> RB51 2,3x10 ⁶	i.p.	<i>B. canis</i> RM6/66 2,8x10 ⁵	i.p.	2	0,319
<i>B. abortus</i> RB51 1x10 ⁸	<i>B. abortus</i> RB51 2,3x10 ⁶	i.n.	<i>B. canis</i> RM6/66 2,8x10 ⁵	i.v.	2	2,13

El índice de protección se determinó restando los valores del logaritmo de las UFC del grupo que se inmunizaron con *B. abortus* RB51 con el control PBS.

4 DISCUSIÓN

B. canis es un patógeno venéreo en perros que, de forma accidental, también puede infectar a seres humanos y animales que entran en contacto con secreciones contaminadas derivadas de perros infectados (Santos *et al.*, 2021). La erradicación de este patógeno ha sido compleja debido a diversos factores que incluyen las prácticas de reproducción irresponsable por parte de los dueños, la ausencia de un tratamiento eficaz, un diagnóstico complejo y la falta de vacunas específicas contra este patógeno (Cosford, 2018, de Souza *et al.*, 2018, Heidary *et al.*, 2022, Woods, 2024). Hasta la fecha ninguno de los candidatos vacunales evaluados, ya sea basados en antígenos recombinantes o en cepas vivas atenuadas, ha demostrado inducir una respuesta inmune suficientemente robusta y segura para su aplicación en esta especie (Clausse *et al.*, 2014, Heidary *et al.* 2022). Sin embargo, todos estos candidatos comparten una limitación metodológica común asociada a la administración sistémica de los antígenos (intraperitoneal o subcutánea) vías que no reproducen la vía natural de infección (mucosa genital) (Stranahan *et al.*, 2022). Considerando estas limitaciones, en este trabajo evaluamos la inmunogenicidad y protección en el tracto genital de ratones BALB/c inmunizados con la vacuna RB51 frente a *Brucella canis* cepa RM6/66.

La vacunación con *B. abortus* RB51 indujo respuestas humorales tanto sistémicas como de mucosas, para los antígenos de *B. canis*, aunque con diferencias según la vía de inmunización. La vía i.p. generó principalmente IgG e IgG2a séricas, mientras que la vía i.n. destacó por su capacidad de inducir IgA en suero y especialmente en mucosa vaginal junto con bajos niveles séricos de IgM e IgG frente a antígenos de *B. canis* RM6/66. Este patrón es consistente con una respuesta inmunitaria focalizada en el compartimento mucosal, donde solo una fracción limitada de los linfocitos activados accede a nivel sistémico, reduciendo la migración de células B hacia bazo y médula ósea y resultando en títulos séricos más bajos de IgG e IgM (Bessa *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2016).

En conjunto estos resultados son relevantes, ya que demuestra que la inmunización i.n. no solo promueve inmunidad heteróloga, sino que también logra establecer una respuesta de mucosa en el sitio genital, lo cual es clave considerando que la transmisión de *B. canis* ocurre por esta vía.

Los resultados con inmunidad tradicional coinciden con lo descrito por Clausse *et al.* (2013), quienes reportaron que candidatos vacunales administrados por vías sistémicas inducen principalmente anticuerpos séricos, sin una respuesta mucosal significativa. En cambio, Boyaka (2017) subraya que la inmunización por mucosas es esencial para generar IgA resistente a las condiciones proteolíticas del tracto genital, lo que explica la superioridad de la vía i.n.

observada en este estudio. En el ensayo de SBA adaptado a secreción vaginal, tanto la vacunación i.n. como la i.p. indujeron anticuerpos capaces de impedir la formación de colonias de *B. canis*. Aunque los anticuerpos por sí solos no eliminaron directamente a la bacteria, ya que su efecto sería aglutinante evitó el crecimiento durante el cultivo. Al combinarse con proteínas del complemento, las secreciones de ambos grupos vacunados bloquearon por completo la formación de UFC, a diferencia del control PBS. Este hallazgo demuestra que los anticuerpos generados por ambas vías adquieren un rol funcional en la protección, aunque posiblemente a través de mecanismos distintos de activación del complemento (vía clásica en el caso i.p. y alterna o de otra naturaleza en la i.n.) o bien mediante funciones no canónicas de los anticuerpos (Dimitrov *et al.* 2020). Estos resultados refuerzan el valor de evaluar no solo la titulación de anticuerpos, sino también funcionalidad de la respuesta humoral inducida por la vacuna RB51.

La IgA en moco vaginal puede interactuar con el sistema del complemento de manera limitada, activando la vía de las lectinas mediante la unión de MBL y la activación de MASP-2, y en menor medida contribuyendo a la activación de la vía alterna, favoreciendo el depósito de C3b sobre superficies microbianas (Wibroe *et al.*, 2014).

En este contexto, los títulos de IgA detectados en moco vaginal deben interpretarse considerando el efecto de dilución asociado al volumen de lavado empleado, cuyos títulos son mayores en protocolos orientados exclusivamente a la cuantificación de anticuerpos. Este enfoque responde a la necesidad de obtener volúmenes suficientes para la realización de ensayos funcionales como el SBA. Estudios en modelos murinos han demostrado que el volumen de lavado introduce un factor de dilución variable, estimado entre un 5–20 % del volumen total recolectado, lo que impacta directamente en los títulos absolutos medidos (Bélec *et al.*, 1995). En contraste, los protocolos centrados únicamente en la cuantificación de IgA utilizan volúmenes mínimos de lavado, maximizando los títulos detectables, pero restringiendo la posibilidad de evaluar funcionalidad de los anticuerpos cuando se requieren mayores volúmenes de muestra (Iversen *et al.*, 2017).

Además, la capacidad de RB51 i.n. de inducir una respuesta inmune frente a antígenos heterólogos de *B. canis* resalta su potencial como candidato vacunal, siguiendo en la línea con reportes recientes donde la administración i.n. de vacunas contra patógenos respiratorios, como *Streptococcus pneumoniae* y SARS-CoV-2, también promovió inmunidad sistémica y de mucosas (Anthi *et al.*, 2025; Kumar *et al.*, 2025).

En este contexto, si bien en los ensayos de SBA se recomienda la inclusión de un suero inmune de referencia como control positivo para monitorear la actividad del complemento (Necchi *et al.*, 2017), en este estudio se optó por no incorporar una muestra sérica dentro del ensayo adaptado a secreción vaginal, con el fin de evitar el uso de muestras distintas (suero y moco vaginal) y mantener el análisis centrado en la funcionalidad de los anticuerpos presentes en el moco vaginal. No obstante, los controles internos implementados permitieron discriminar entre la actividad aglutinante de los anticuerpos y su capacidad de activar el complemento. Aun así, se reconoce que la realización de un SBA convencional en paralelo habría permitido integrar de manera más completa el rol de los anticuerpos inducidos por RB51 tanto a nivel sistémico como mucosal frente a *B. canis* RM6/66.

El análisis del perfil de citocinas reveló que la inmunización i.n. de RB51 promovió una respuesta del tipo Th1, evidenciada por niveles elevados de IFN- γ y TNF- α . En contraste, no se detectó IL-4, descartando una activación de la vía Th2. Estos hallazgos son relevantes, ya que refuerza el sesgo Th1 característico de la inmunidad protectora frente a *Brucella*, la que depende principalmente de la activación de linfocitos CD4⁺ Th1 productores de IFN- γ , los cuales promueven la activación de macrófagos y la eliminación de bacterias intracelulares. En cambio, un predominio de IL-4 está vinculado con una menor

activación de macrófagos, una eliminación ineficiente del patógeno y la persistencia de la infección, favoreciendo el establecimiento de formas crónicas de la enfermedad (Kerrinnes *et al.*, 2018).

En este contexto, la relevancia de una respuesta Th1 inducida por la vacunación i.n. frente a *Brucella* ha sido ampliamente documentada, en concordancia con el carácter intracelular del patógeno y la necesidad de una activación macrofágica dependiente de IFN- γ (Wen *et al.*, 2024, Clapp *et al.*, 2016, Pascual *et al.*, 2022). Estudios previos han demostrado que la inmunización por vía mucosal es particularmente eficiente en promover respuestas Th1 robustas, tanto a nivel local como sistémico, favoreciendo el control bacteriano (Clapp *et al.*, 2016). Adicionalmente, variantes modificadas de la vacuna RB51, incluyendo cepas recombinantes que sobreexpresan superóxido dismutasa (SOD) y estrategias basadas en ADN/ARN, han mostrado potenciar la polarización Th1 y mejorar la protección frente a *Brucella* (Zhu *et al.*, 2011, Escalona *et al.*, 2017, Luo *et al.*, 2025). En conjunto, estos antecedentes respaldan que el perfil inmunológico inducido por la inmunización i.n. con RB51 observado en este estudio se asocia a mecanismos de protección previamente descritos para candidatos vacunales frente a *Brucella*.

Estos resultados coinciden con lo descrito en modelos vacunales donde la activación de la vía Th1 se asocia a protección frente a *Brucella* (Keegan *et al.*,

2021). En contraste, estudios como el de Hur y Baek (2010) demostraron protección clínica en perros vacunados con RB51 sin evidenciar títulos de anticuerpos ni caracterización inmunológica, lo que limita la comprensión de los mecanismos subyacentes. En conjunto, estos hallazgos refuerzan que la inmunización i.n. con RB51 podrían haber promovido una inmunidad protectora mediada por citocinas en el tejido vaginal, evidenciada por la ausencia de colonias de RM6/66 en bazo.

Uno de los parámetros más relevantes al evaluar una vacuna es su capacidad de conferir protección frente a un desafío patógeno. En este estudio, la inmunización i.n. con RB51 mostró un índice de protección de 2,13 frente a *B. canis* RM6/66, con ausencia total de bacterias en el bazo. Este hallazgo sugiere que la vía i.n. fue capaz de impedir la colonización sistémica, ya sea bloqueando el acceso del patógeno por acción de los anticuerpos a las mucosas, al torrente sanguíneo o favoreciendo su eliminación temprana a nivel de mucosas. De acuerdo con los criterios propuestos por Kahl-McDonagh y Ficht (2006), este nivel de protección puede considerarse bueno dentro de los parámetros establecidos para la vacunación contra *Brucella*. En este contexto, se puede tener como referencia el índice obtenido para la vacunación oral con RB51, que alcanzó un índice de protección de 3,5 (buena) frente a desafíos orales con *B. abortus* 2308 dos semanas después de la inmunización con dos dosis (Pasquali

et al., 2003), y con el candidato rOmp31 de *B. canis* formulado con Quin A aplicado subcutáneo, el cual alcanzó un índice de 1,86 (moderada) frente a *B. canis* RM6/66 (Clausse *et al.*, 2014).

Referente al índice de protección obtenidos en este estudio, resultados similares fueron reportados por Hur y Baek (2010), quienes observaron ausencia de colonización esplénica en perros vacunados con RB51 y desafiados oralmente con *B. canis*, aunque sin caracterización inmunológica que explicara el mecanismo de protección. La coincidencia entre ambos estudios refuerza la hipótesis de que la inmunidad de mucosas inducida por RB51 podría jugar un rol clave en prevenir la diseminación bacteriana sistémica.

En este estudio se demostró que los anticuerpos inducidos por la vacunación, tanto por vía i.n. como i.p., cumplen un rol funcional clave al aglutinar *B. canis* RM6/66 y activar el complemento, ya sea a nivel de moco vaginal o en el tejido, contribuyendo a la eliminación bacteriana. En contraste, la participación de linfocitos T residentes en tejidos (T_{RM}) se mantiene como una hipótesis basada en la producción de citocinas, sin evidencia directa en este modelo. Lo más relevante es que la vacunación i.n. con RB51 logró bloquear eficazmente la diseminación de RM6/66 hacia el bazo, lo que refuerza el potencial de esta vía como estrategia protectora, y la capacidad de los anticuerpos para

neutralizar o bloquear el paso de la bacteria desafiante hacia circulación sanguínea.

En la Figura 14 se resume el modelo propuesto para explicar la inducción de inmunidad vaginal tras la inmunización intranasal con RB51, en el marco del sistema inmune común de mucosas (CMIS). Tras la captación antigénica en el NALT, las células dendríticas activan linfocitos T y B que adquieren un perfil de homing mucosal, permitiendo su migración hacia sitios mucosales distantes, incluida la mucosa genital.

La expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ facilitaría la adhesión al endotelio de vénulas mucosales mediante su interacción con MAdCAM-1 (Hawkins *et al.*, 2000), mientras que receptores quimiotácticos como CCR5 contribuirían a la migración dirigida de linfocitos activados y células plasmáticas hacia el epitelio y el estroma vaginal y cervical, especialmente en un contexto inflamatorio (Takamura, 2018). Una vez en el tejido, la retención local podría estar mediada por moléculas como CD69, que inhibe la señalización de S1P1 y limita la recirculación, y CD103, que favorece la adhesión a E-cadherina expresada por el epitelio genital (Liao *et al.*, 2024).

Como consecuencia, células plasmáticas productoras de IgA se acumularían en la mucosa vaginal (Wu *et al.*, 2000), donde la IgA secretora podría ejercer un rol protector temprano mediante la neutralización del patógeno, el bloqueo de

su adhesión y la exclusión inmune, y potencialmente mediante su interacción funcional con proteínas del complemento. Adicionalmente, y aunque no fue evaluado directamente, la inmunización intranasal podría favorecer el establecimiento de T_{RM} que, junto con células T efectoras reclutadas, coordinarían una respuesta local rápida mediada por $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$, posiblemente promoviendo la activación de macrófagos y la eliminación eficiente de *B. canis* (Woodwin *et al.*, 2022).

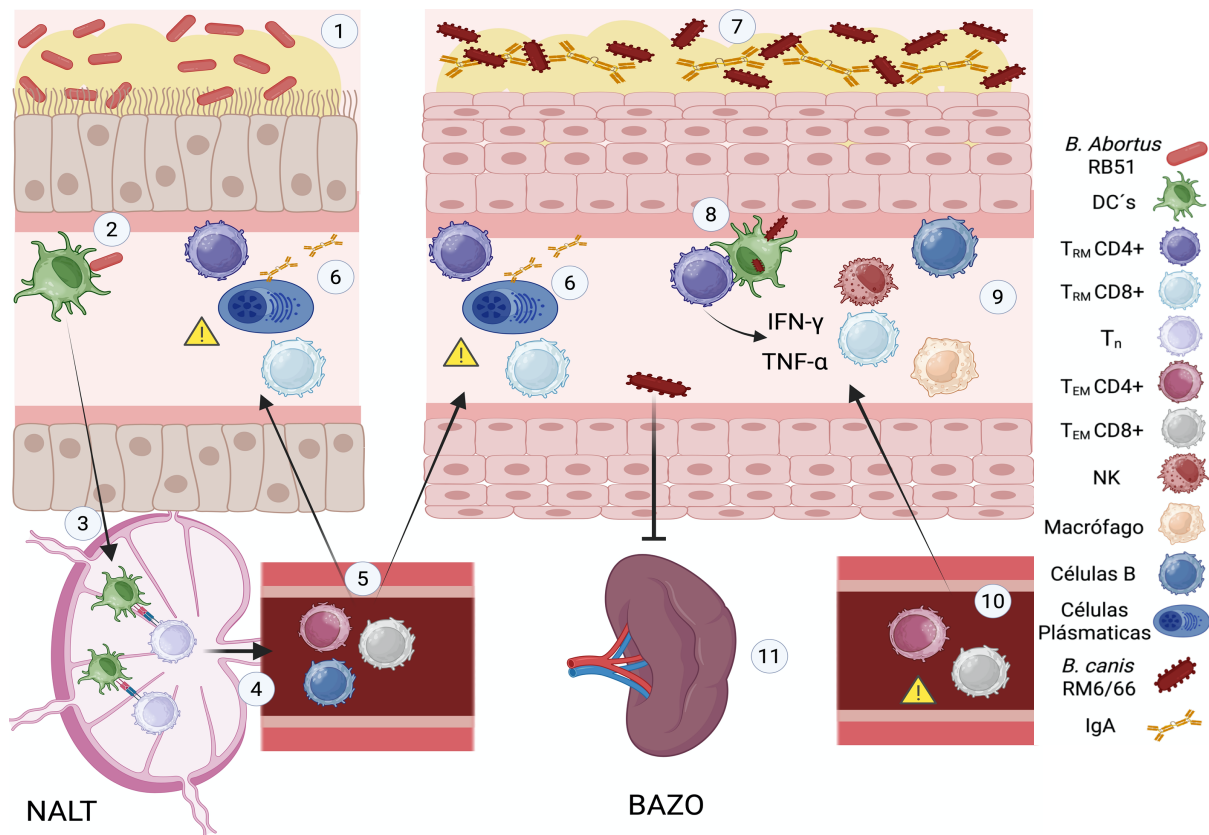


Figura 14: Activación del sistema común de mucosas por vía intranasal con RB51.

1. Inmunización i.n. con *B. abortus* RB51. 2. Fagocitosis por las DC's. 3. Presentación de antígenos y capacitación de los Linfocitos T naive (T_n). 4 y 5. Linfocitos T_{EM} $CD4^+$, $CD8^+$ y Células B migrando a circulación. 6. Linfocitos T_{RM} $CD4^+$, $CD8^+$ y Células plásmaticas liberando IgA en mucosas. 7. Desafío i.v. con *B. canis* RM6/66. 8. Presentación de antígenos por DC's a T_{RM} $CD4^+$, producción de $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$. 9. Activación de células inmunes. 10. Migración de T_{EM} a mucosas. 11. Bloqueo de *B. canis* RM6/66 a circulación.

En el contexto de la medicina veterinaria y la salud pública, faltan investigaciones que caractericen la respuesta inmunológica del perro frente a la infección por *B. canis* (Stranahan *et al.*, 2022), particularmente en el marco de la inmunidad común de mucosas (López-Santiago *et al.*, 2019). En este ámbito, si bien existe mayor claridad sobre los mecanismos que regulan la formación

de $T_{RM} CD8^+$, se dispone de menos información sobre la diferenciación de $T_{RM} CD4^+$ efectores de $IFN-\gamma$, los cuales, en base a estudios en patógenos de transmisión sexual y de forma indirecta a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, serían clave para orquestar la eliminación del patógeno (Hirahara *et al.*, 2021, Kirkby and Veldhoen. 2025). Como el modelo murino BALB/c se encuentra validado para el estudio de *B. canis* en perros (Stranahan *et al.*, 2022), los hallazgos aquí presentados son extrapolables como evidencia inicial y constituyen un primer paso para el desarrollo de estudios en el hospedero natural, incluyendo la vacunación i.n., la medición de anticuerpos en secreciones vaginales en perras y el estudio de $T_{RM} CD4^+$ en tejido uterino (López-Santiago *et al.*, 2019). Desde el punto de vista sanitario, la ausencia de estudios de prevalencia a nivel nacional refleja que la brucelosis canina continúa siendo una enfermedad subestimada en Chile en comparación con otras brucelosis, lo que limita su control. En este escenario, resulta necesario considerar a *B. canis* como enfermedad de reporte obligatorio en perros, implementar programas de monitoreo y toma de muestras sistemática, y desarrollar campañas de educación dirigidas a la comunidad, en coordinación entre el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y el Servicio de Salud, como estrategias clave para enfrentar a la Brucelosis canina (Galarce *et al.*, 2020).

Finalmente, se debe indicar que este trabajo presento una limitación metodológica importante, el cual consistio en que los grupos vacunados no fueron sometidos al mismo tipo de desafío, lo que dificulta la comparación directa entre las vías de administración. Para evaluar adecuadamente la eficacia de la vacunación i.n. frente a la i.p., ambas deberían ser contrastadas mediante un desafío i.v., que reproduce la vía natural de infección. Asimismo, los ensayos de citometría de flujo no detectaron diferencias en la frecuencia de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ entre los grupos vacunados y controles, motivo por el cual estos resultados no fueron incluidos, dado que no puede descartarse la ocurrencia de un error técnico.

En este contexto, y en el supuesto de haberse detectado diferencias en la proliferación, una limitación adicional habría sido la ausencia de un control con células dendríticas no sensibilizadas, lo que habría restringido la discriminación entre proliferación basal inducida por señales coestimuladoras inespecíficas y respuestas dependientes de antígeno, limitando la interpretación de la especificidad de la respuesta celular (Lehmann *et al.*, 2017). Asimismo, no fue posible evaluar de manera directa la presencia de células T_{RM} ni de subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺, por lo que su posible participación se describe de forma especulativa, basada en evidencia reportada en estudios previos.

Por otra parte, una limitación de este estudio es que la duración de la respuesta inmune inducida por la vacunación no fue evaluada más allá de los 45 días post-inmunización. En consecuencia, no fue posible determinar la persistencia a largo plazo de la inmunidad mucosal y sistémica ni la mantención de los mecanismos de protección en períodos prolongados, por lo que futuros estudios deberán incorporar tiempos de seguimiento más extensos para evaluar la durabilidad de la respuesta inmune y la eventual necesidad de refuerzos vacunales.

El uso del modelo murino para el estudio de la inmunidad de mucosas frente a *B. canis* se sustenta en la conservación de mecanismos inmunológicos clave en la mucosa genital de los mamíferos, como la inducción de IgA secretora y respuestas Th1 mediadas por IFN- γ , lo que ha permitido su amplio empleo en la evaluación preclínica de candidatos vacunales y en el análisis controlado de respuestas inmunes locales y sistémicas (López-Santiago *et al.*, 2019, Pascual *et al.*, 2022, Stranahan *et al.*, 2022). No obstante, existen diferencias fisiológicas relevantes entre la mucosa genital murina y canina, principalmente asociadas a la duración y dinámica del ciclo estral. Mientras que la perra presenta un ciclo monoéstrico con un período de anestro prolongado y estabilidad hormonal relativa (Concannon, 2011), el ratón exhibe ciclos estrales cortos y poliestrales, con fluctuaciones frecuentes de estrógenos y progesterona que modulan la

producción y el transporte de anticuerpos mucosales (Byers *et al.*, 2012), especialmente IgA e IgG (Gockel *et al.*, 2003). En consecuencia, los resultados obtenidos en ratón deben interpretarse como evidencia preclínica, reconociendo estas limitaciones al extrapolar las respuestas inmunes genitales al hospedero natural.

5 CONCLUSIONES

- La vacunación intranasal en el modelo murino con *B. abortus* RB51 indujo una respuesta inmune humoral que sería aglutinante y activadora del complemento, junto con una respuesta inmune celular tipo Th1 caracterizada por la producción de IFN- γ y TNF- α .
- La inmunización intranasal evidenció una mayor eficacia protectora respecto de su control, observándose la ausencia de *B. canis* RM6/66 en el bazo tras el desafío intravaginal.

6 BIBLIOGRAFIA

- Abbot, A., and Smith, J. (2020). The role of adaptive immunity in the control of *Brucella* infections. *J. Immunol. Res.* 2020, Article ID 1234567.
- Allen, C. A., and Adams, L. G. (2010). Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34(3), 379-392.
- Anthi, A.K., Kolderup, A., Vaage, E.B. *et al.* (2025). An intranasal subunit vaccine induces protective systemic and mucosal antibody immunity against respiratory viruses in mouse models. *Nat. Commun.* 16, 3999. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59353-6>.
- Atluri, W. L., Xavier, M. N., de Jong, M. F., and Tsolis, R. M. (2011). *Brucella*: A pathogen without an arsenal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1, Article 17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00017>.
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J. M., Scholz, H. C. (2009). *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC genom.* 10(1), 1-18.
- Bai Z, Wan D, Lan T, Hong W, Dong H, Wei Y, Wei X. (2024). Nanoplatform Based Intranasal Vaccines: Current Progress and Clinical Challenges. *ACS Nano.* 10;18(36):24650-24681. doi: 10.1021/acsnano.3c10797.

- Balin SJ, Pellegrini M, Klechevsky E, Won ST, Weiss DI, Choi AW, Hakimian J, Lu J, Ochoa MT, Bloom BR, Lanier LL, Stenger S, Modlin RL. (2018). Human antimicrobial cytotoxic T lymphocytes, defined by NK receptors and antimicrobial proteins, kill intracellular bacteria. *Sci. Immunol.* 3(26):eaat7668. doi: 10.1126/sciimmunol.aat7668.
- Bamias, G., Kitsou, K., and Rivera-Nieves, J. (2023). The underappreciated role of secretory IgA in IBD. *Inflamm. Bowel. Dis.* 29(8), 1327–1341.
- Bélec L, Meillet D, Lévy M, Georges A, Tévi-Bénissan C, Pillot J. (1995). Dilution assessment of cervicovaginal secretions obtained by vaginal washing for immunological assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2(1):57-61. doi: 10.1128/cdli.2.1.57-61.1995.
- Bessa J, Zabel F, Link A, Jegerlehner A, Hinton HJ, Schmitz N, Bauer M, Kündig TM, Saudan P, Bachmann MF. (2012). Low-affinity B cells transport viral particles from the lung to the spleen to initiate antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 11;109(50):20566-71. doi: 10.1073/pnas.1206970109.
- Borie, C., Bravo, C., Dettleff, P., Galarce, N., Dorner, J., & Martínez, V. (2021). First genome sequence of Chilean *Brucella canis* SCL strain provides insights on the epidemiology and virulence factors, explaining

- differences between geographical origins. *Electron. J. Biotechnol.* 49, 1-4.
- Borie, C., Galarce, N. (2015). *Brucella canis*. *Rev. Chil. Infectol.* 32(2), 219-220.
- Borie, C., Galarce, N., Escobar, B., Dorner, J., Dettleff, P., Martínez, V. (2022). Diversidade genética em *Brucella canis*: aplicação no desenvolvimento de vacinas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 46(4), 409-412. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2022.041.
- Borie, C., Luisa, M., Sánchez, Ch. (2002). Brucelosis en el perro. *TecnoVet.* 8(1).
- Boyaka, P.N. (2017). Inducing Mucosal IgA: A Challenge for Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. *J. Immunol.* 199 (1): 9–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601775>.
- Brandtzaeg, P. (2013). Secretory IgA: designed for anti-microbial defense. *Front. Immunol.* 4, 222.
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one.* 7(4), e35538.
- Byndloss, M. X., and Tsolis, R. M. (2021). The mechanism of facultative intracellular parasitism of *Brucella*. *Int. J. Mol. Sci.* 22(7), 3673. <https://doi.org/10.3390/ijms22073673>.

- Cannella, A. P., Tsolis, R. M., Liang, L., Felgner, P. L., Saito, M., Sette, A., Sette, A., Vinetz, J. M. (2012). Antigen-specific acquired immunity in human brucellosis: implications for diagnosis, prognosis, and vaccine development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2 , 1.
- Carmichael, L. (2000). *Brucella canis*. In: Nielsen, K. y Duncan. (Eds.). *Animal Brucellosis*. J. Editorial CRC Press. Florida. U.S.A. 335-350.
- Carmichael, L. E., Zoha, S. J., Flores-Castro, R. (1984). Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Dev. Biol. Stand.* 56, 371-383.
- Carmichael, L., Greene, C. (2008). Brucelosis canina. In: Greene, C. (Eds.). *Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos*. 3a Edición. Editorial Inter-Medica. Buenos Aires, Argentina. 411-424.
- Carvalho, T. P. D., Silva, L. A. D., Castanheira, T. L. L., Souza, T. D. D., Paixão, T. A. D., Lazaro-Anton, L., Tsolis, R. M., and Santos, R. L. (2023). Cell and tissue tropism of *Brucella* spp. *Infect.Immun.*, 91(2), e00062-23.
- Cesta, M. F. (2006). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol.Pathol.*, 34(5), 599–608. <https://doi.org/10.1080/01926230600865531>.

- Chacón-Díaz C, Altamirano-Silva P, González-Espinoza G, Medina M, Alfaro-Alarcón A, Bouza-Mora L, Jiménez-Rojas C, Wong M, Barquero-Calvo ERojas N, Guzmán-Verri CMoreno E, Chaves-Olarte E. (2015). *Brucella canis* Is an Intracellular Pathogen That Induces a Lower Proinflammatory Response than Smooth Zoonotic Counterparts. *Infect. Immun*83: <https://doi.org/10.1128/iai.00995-15>
- Chen, Y., Smith, J., and Johnson, M. (2023). Mechanisms of immune regulation in bacterial infections. *eLife*.12. e89210. <https://doi.org/10.7554/eLife.89210>.
- Christo, S. N., Park, S. L., Mueller, S. N., & Mackay, L. K. (2024). The multifaceted role of tissue-resident memory T cells. *Annual Review of Immunology*, 42(1), 317-345.
- Clapp B, Yang X, Thornburg T, Walters N, Pascual DW. (2016). Nasal vaccination stimulates CD8(+) T cells for potent protection against mucosal *Brucella melitensis* challenge. *Immunol. Cell. Biol.* 94(5):496-508. doi: 10.1038/icb.2016.5.
- Clausse M, Díaz A. G, Ghersi G, Zylberman V, Cassataro J, Giambartolomei G. H, Goldbaum F. A, Estein S. M. (2013). The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. *Vaccine*. 31(51), 6129-6135.

- Clausse M, Díaz AG, Ibañez AE, Cassataro J, Giambartolomei GH, Estein SM. (2014). Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c mice. Clin. Vaccine. Immunol. 21(12):1689-94.
- Clausse M, Díaz AG, Pardo RP, Zylberman V, Goldbaum FA, Estein SM. (2017). Polymeric antigen BLSOmp31 in aluminium hydroxide induces serum bactericidal and opsonic antibodies against *Brucella canis* in dogs. Vet. Immunol. Immunopathol. 184, 36-41.
- Corthésy, B. (2013). Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. Front. Immunol. 4,185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00185>.
- Corthésy, B., and Spertin, F. (1999). Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. Biol. Chem. 380(11), 1251–1262.
- Dadelahi, A. S., Lacey, C. A., Chambers, C. A., Ponzilacqua-Silva, B., and Skyberg, J. A. (2020). B cells inhibit CD4+ T cell-mediated immunity to *Brucella* infection in a major histocompatibility complex class II-dependent manner. Infect.Immun. 88(8), e00075-20.
- Davidson, A., Sykes, J. (2014). Canine Brucellosis In: Sykes, J. Canine and Feline Infectious Diseases. Elsevier. Missouri. St. Louis, USA. 512-519.

- de Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., and Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*–Host Interactions. *Am. J. Pathol.* 185(6), 1505-1517.
- de Souza, T.D., de Carvalho, T.F., Mol, J.P.d.S. *et al.* (2018). Tissue distribution and cell tropism of *Brucella canis* in naturally infected canine fetuses and neonates. *Sci. Rep.* 8, 7203
- Dimitrov JD, Lacroix-Desmazes S. (2020). Noncanonical Functions of Antibodies. *Trends Immunol.* 41(5):379-393.
- Diptee, M. D., Adesiyun, A. A., Asgarali, Z., Campbell, M., and Adone, R. (2006). Serologic responses, biosafety and clearance of four dosages of *Brucella abortus* strain RB51 in 6–10 months old water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109(1-2), 43-55.
- Escalona E, Sáez D, Oñate A. (2017). Immunogenicity of a Multi-Epitope DNA Vaccine Encoding Epitopes from Cu-Zn Superoxide Dismutase and Open Reading Frames of *Brucella abortus* in Mice. *Front. Immunol.* 9;8:125. doi: 10.3389/fimmu.2017.00125.
- Fox, K. F., Fox, A., Nagpal, M., Steinberg, P., Heroux, K. (1998). Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. *J. Clin. Microbiol.* 36(11), 3217-3222.

- Galarce, N., Escobar, B., Martínez, E., Alvarado, N., Peralta, G., Dettleff, P., Dorner, J., Martínez, V. y Borie Polanco, C. (2020). Prevalence and genomic characterization of *Brucella canis* strains isolated from kennels, household, and stray dogs in Chile. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/179706>.
- Giambartolomei, G. H., Scian, R., Acosta-Rodríguez, E., Fossati, C. A., Delpino, M. V. (2012). *Brucella abortus*-Infected Macrophages Modulate T Lymphocytes to Promote Osteoclastogenesis via IL-17. *Am. J. Pathol.* 181(3), 887-896.
- Gockel CM, Bao S, Holland MK, Beagley KW. (2003). Influence of the murine oestrous cycle on the induction of mucosal immunity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50(5):369-79. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.00097.x.
- Golding, B., D. E. Scott, O. Scharf, L. Y. Huang, M. Zaitseva, C. Lapham, N. Eller, and H. Golding. (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes. Infect.* 3:43-8.
- Gomes MT, Campos PC, de Almeida LA, Oliveira FS, Costa MM, Marim FM, Pereira GS, Oliveira SC. (2012). The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 25;2:130.
- Gómez, V. (2007). Seroprevalencia de brucelosis canina por *B. canis* en clínicas Veterinarias del Gran Santiago 2002-2003. Memoria Título Médico

Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 1-44.

Goodwin ZI, Yang X, Hoffman C, Pascual DW. (2022). Live mucosal vaccination stimulates potent protection via varied CD4+ and CD8+ T cell subsets against wild-type *Brucella melitensis* 16M challenge. *Front. Immunol.* 2022 Oct 3;13:995327. doi: 10.3389/fimmu.2022.995327. PMID: 36263034; PMCID: PMC9574439.

Guo, X., Zeng, H., Li, M., Xiao, Y., Gu, G., Song, Z., Shuai, X., Guo, J., Huang, Q., Zhou, B., Chu, Y., and Jiao, H. (2023). The mechanism of chronic intracellular infection with *Brucella* spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1129172. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1129172>.

Hassert, M., and Harty, J. T. (2022). Tissue resident memory T cells - A new benchmark for the induction of vaccine-induced mucosal immunity. *Front. Immunol.* 13:1039194. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1039194>.

Hawkins RA, Rank RG, Kelly KA. (2000). Expression of mucosal homing receptor alpha4beta7 is associated with enhanced migration to the Chlamydia-infected murine genital mucosa in vivo. *Infect. Immun.* 68(10):5587-94. doi: 10.1128/IAI.68.10.5587-5594.2000

- Heidary, M., Dashtbin, S., Ghanavati, R., Mahdizade Ari, M., Bostanghadiri, N., Darbandi, A., *et al.* (2022). Evaluation of brucellosis vaccines: a comprehensive review. *Front. Vet. Sci.* 9, 925773.
- Hirahara K, Kokubo K, Aoki A, Kiuchi M, Nakayama T. (2021) The Role of CD4+ Resident Memory T Cells in Local Immunity in the Mucosal Tissue - Protection Versus Pathology. *Front. Immunol.* 21;12:616309. doi: 10.3389/fimmu.2021.616309.
- Hoffmann, E. M., & Houle, J. J. (1995). Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. *Crit. Rev. Microbiol.* 21(3), 153-163.
- Hollett, R. B. (2006). Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology.* 66(3), 575-587.
- Hur, J., Baek, B. K. (2010). Efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in Korean mongrel dogs against virulent strains of *B. abortus* biotype 1 and *B. canis*. *Korean. J. Vet. Serv.* 33(1), 29-35.
- Huy TXN, Nguyen TT, Kim H, Reyes AWB, Kim S. (2022). *Brucella* Phagocytosis Mediated by Pathogen-Host Interactions and Their Intracellular Survival. *Microorganisms.* 11;10(10):2003. doi: 10.3390/microorganisms10102003.

- Iversen MB, Paludan SR, Holm CK. (2017). Vaginal HSV-2 Infection and Tissue Analysis. *Bio. Protoc.* 5;7(13):e2383. doi: 10.21769/BioProtoc.2383.
- Juge, N. (2022). Relationship between mucosa-associated gut microbiota and human diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 50(5), 1225–1236. <https://doi.org/10.1042/BST20201201>.
- Kahl-McDonagh MM, Ficht TA. (2006). Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 74(7):4048-57. doi: 10.1128/IAI.01787-05.
- Keegan AD, Leonard WJ, Zhu J. (2021). Recent advances in understanding the role of IL-4 signaling. *Fac. Rev.* 7;10:71. doi: 10.12703/r/10-71.
- Kerrinnes TWinter MG, Young BM, Diaz-Ochoa VE, Winter SE, Tsolis RM. (2018). Utilization of Host Polyamines in Alternatively Activated Macrophages Promotes Chronic Infection by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 86:10.1128/iai.00458-17. <https://doi.org/10.1128/iai.00458-17>.
- Kirkby M, Veldhoen M. (2025) CD4+ tissue-resident memory T cells and their role in immunity. *Immunol. Cell. Biol.* 103(8):809-819. doi: 10.1111/imcb.70052.

- Kumar S, Hazlett K, Bai G. Mucosal immunity elicited by a human-Fcγ receptor-I targeted intranasal vaccine platform enhances resistance against nasopharyngeal colonization of *Streptococcus pneumoniae* and induces broadly protective immunity against respiratory pathogens. *Vaccine*. 2025 Feb 27;48:126729. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.126729.
- Lehmann CHK, Baranska A, Heidkamp GF, Heger L, Neubert K, Lühr JJ, Hoffmann A, Reimer KC, Brückner C, Beck S, Seeling M, Kießling M, Soulat D, Krug AB, Ravetch JV, Leusen JHW, Nimmerjahn F, Dudziak D. (2017). DC subset-specific induction of T cell responses upon antigen uptake via Fcγ receptors *in vivo*. *J. Exp. Med.* 2017 May 1;214(5):1509-1528. doi: 10.1084/jem.20160951.
- Leyan, V., Chihuailaf, R., and Ortega, M. (2015). Humoral and cellular immune response to *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in grazing heifers supplemented with selenium and α-tocopherol. *Arch.Med.Vet.* 47(2), 125–132.
- Liao, J., Yu, X., Huang, Z., He, Q., Yang, J., Zhang, Y., *et al.* Tao, Q. (2024). Chemokines and lymphocyte homing in Sjögren's syndrome. *Front. Immunol.* 15, 1345381.
- Liu Y, Sun J, Peng X, Dong H, Qin Y, Shen Q, Jiang H, Xu G, Feng Y, Sun S, Ding J, Chen R. (2020). Deletion of the LuxR-type regulator VjbR in

- Brucella canis* affects expression of type IV secretion system and bacterial virulence, and the mutant strain confers protection against *Brucella canis* challenge in mice. *Microb. Pathog.* 139:103865. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103865.
- López-Santiago R, Sánchez-Argáez AB, De Alba-Núñez LG, Baltierra-Uribe SL, Moreno-Lafont MC. (2019). Immune Response to Mucosal *Brucella* Infection. *Front. Immunol.* 20;10:1759. doi: 10.3389/fimmu.2019.01759. PMID: 31481953; PMCID: PMC6710357.
- Luo, J. R., Qi, X. X., Tian, T. T., Shang, K. Y., Shi, H. D., Li, C., *et al.* Zhang, F. B. (2025). Design of a multi-Epitope mRNA vaccine against *Brucella* type IV secretion system using reverse vaccinology and immunogenicity approaches. *Sci. Reports.* 15(1), 30698.
- Mantis, N. J., Rol, N., and Corthésy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 4(6), 603–611. doi: 10.1038/mi.2011.41.
- Martirosyan, A., & Gorvel, J. P. (2013). *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future. Microbiol.* 8(2), 147-154.
- Martirosyan, A., Moreno, E., and Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol. Rev.* 240(1), 211-234.

- Mazumdar, V., Joshi, K., Nandi, B. R., Namani, S., Gupta, V. K., and Radhakrishnan, G. (2022). Host F-Box Protein 22 enhances the uptake of Brucella by macrophages and drives a sustained release of proinflammatory cytokines through degradation of the anti-inflammatory effector proteins of Brucella. *Infect. Immun.* 90(e00060-22). <https://doi.org/10.1128/iai.00060-22>.
- Montalvillo, E., Garrote, J. A., Bernardo, D., and Arranz, E. (2014). Células linfoides innatas y células T natural killer en el sistema inmune del tracto gastrointestinal. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 106(5), 304-312.
- Moreno, E., Cloeckert, A., Moriyón, I. (2002). Brucella evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.* 90(1-4), 209-227.
- Moriyón, I., Grilló, M., Monreal, D., González, D., Marín, C., López-Goñi, I., *et al.* Blasco, J. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.* 35(1), 1-38.
- Münz C, Steinman RM, Fujii S. (2005). Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 202(2):203-7. doi: 10.1084/jem.20050810.
- Muraille, E., Leo, O., and Moser, M. (2014). TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape

mechanism? Front. Immunol. 5, 603. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00603>.

Nabekura, T., and Shibuya, A. (2021). Type 1 innate lymphoid cells: Soldiers at the front line of immunity. *Biomed. J.*, 44(2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.10.001>.

Necchi F, Saul A, Rondini S. (2017). Development of a high-throughput method to evaluate serum bactericidal activity using bacterial ATP measurement as survival readout. *PLoS One*. 12(2):e0172163.

Nochi T, Imai T, Koyanagi N, Kunisawa J, Kawaguchi Y, Kiyono H. (2014). Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. *J. Virol.* 88(23):13699-708. doi: 10.1128/JVI.02279-14.

Noyma, M., Azevedo, E., Alves, T., Lima, R. (2009). The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Cienc. Rural.* 39(7), 2252- 2260.

Obrist, W. (2005). Seroprevalencia de *Brucella canis* en una población canina perteneciente a la comuna de San Bernardo, Región Metropolitana. Tesis Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Santo Tomás. Facultad de Medicina Veterinaria. 1-57.

- Oliveira, S. C. (2021). Host immune responses and pathogenesis to *Brucella* spp. infection. *Pathogens*, 10(3), 288. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030288>.
- Olsen, S. C., & Palmer, M. V. (2014). Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Vet. Pathol.* 51(6), 1076-1089.
- Oñate, A. A., Céspedes, S., Cabrera, A., Rivers, R., González, A., Muñoz, C., Folch, H., Andrews, E. (2003). A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 71(9), 4857-4861.
- Palmer, M. V., & Cheville, N. F. (1997). Effects of oral or intravenous inoculation with *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in beagles. *Am. J. Vet. Res.* 58(8), 851-856.
- Pascual, D. W., Goodwin, Z. I., Bhagyaraj, E., Hoffman, C., & Yang, X. (2022). Activation of mucosal immunity as a novel therapeutic strategy for combating brucellosis. *Front. Microbiol.* 13, 1018165.
- Pasquali P, Rosanna A, Pistoia C, Petrucci P, Ciuchini F. (2003). *Brucella abortus* RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain *B. abortus* 2308. *Infect. Immun.* 71(5):2326-30. doi: 10.1128/IAI.71.5.2326-2330.2003.

- Pellegrini JM, Gorvel JP, Mémet S. (2022). Immunosuppressive Mechanisms in Brucellosis in Light of Chronic Bacterial Diseases. *Microorganisms*. 10(7):1260. doi: 10.3390/microorganisms10071260.
- Pesce B, Ribeiro CH, Larrondo M, Ramos V, Soto L, Catalán D, Aguillón JC. (2022). TNF- α Affects Signature Cytokines of Th1 and Th17 T Cell Subsets through Differential Actions on TNFR1 and TNFR2. *Int. J. Mo. Sci.* 18;23(16):9306. doi: 10.3390/ijms23169306.
- Piersma, S. J. (2024). Tissue-specific features of innate lymphoid cells in antiviral defense. *Cell.Mol.Immunol.* , 1–15.
- Pujol, M., Borie, C., Montoya, M., Ferreira, A., Vernal, R. (2019). *Brucella canis* induces canine CD4⁺ T cells multi-cytokine Th1/Th17 production via dendritic cell activation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 68-75.
- Pujol, M., Castillo, F., Alvarez, C., Rojas, C., Borie, C., Ferreira, A., Vernal, R. (2017). Variability in the response of canine and human dendritic cells stimulated with *Brucella canis*. *Vet. Res.* 48(1), 1-13.
- Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, Splitter GA. (2004). Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol.* 186(15):5040-51. doi: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.

- Randall, T. D., and Mebius, R. E. (2014). The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with micro-organisms. *Mucosal Immunol.* 7(3), 455–466. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.4>.
- Rivers, R., Andrews, E., Gonzalez-Smith, A., Donoso, G., and Onate, A. (2006). *Brucella abortus*: immunity, vaccines, and prevention strategies based on nucleic acids. SciELO.
- Rojas, J., and Berrios, C. (2014). Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with a DNA vaccine encoding p39 and sp41 of *Brucella melitensis*. *Rev. Med. Vet.* 46(1), 55-62.
- Rossetti, C. A., Drake, K. L., Lawhon, S. D., Nunes, J., Gull, T., Khare, S., and Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*'s interactions with the host immune system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, Article 43. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00043>.
- Ruddle, N. H., and Akirav, E. M. (2009). Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *J. Immunol.*, 183(4), 2205–2212. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804324>.

- Sánchez Vega, F. (2017). Seroprevalencia de brucelosis canina en perros con dueño del gran Santiago y factores de riesgo asociados a su presentación. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/151069>
- Sánchez-Salguero, E. S., & Santos-Argumedo, L. (2018). La asociación de la microbiota humana con la inmunoglobulina A y su participación en la respuesta inmunológica. *Rev. Alerg. Méx.* 65(3), 264-278.
- Santos, R. L., Souza, T. D., Mol, J. P., Eckstein, C., Paixão, T. A. (2021). Canine Brucellosis: an update. *Front. Vet. Sci.* 8, 594291.
- Sauter, M., Sauter, R. J., Nording, H., Olbrich, M., Emschermann, F., and Langer, H. F. (2022). Protocol to isolate and analyze mouse bone marrow derived dendritic cells (BMDC). *STAR Protoc.* 3(3), 101664. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101664>.
- Sher, A., and Coffman, R. L. (2001). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Cell.* 106(3), 257-260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00455-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00455-X).
- Stary G, Olive A, Radovic-Moreno AF, Gondek D, Alvarez D, Basto PA, Perro M, Vrbanac VD, Tager AM, Shi J, Yethon JA, Farokhzad OC, Langer R, Starnbach MN, von Andrian UH. (2015). A mucosal vaccine against *Chlamydia trachomatis* generates two waves of protective memory T

cells. VACCINES. 19;348(6241):aaa8205. doi:
10.1126/science.aaa8205.

Stein, S. H., and Phipps, R. P. (1992). Anti-class II antibodies potentiate IgG2a production by lipopolysaccharide-stimulated B lymphocytes treated with prostaglandin E2 and IFN-gamma. *J. Immunol.* 148(12), 3943–3949. PMID: 1318336.

Stranahan LW, Garcia-Gonzalez DG, Hensel ME, Arenas-Gamboa AM. (2022). Primary and memory immune responses against rough *Brucella canis* are less robust compared to smooth *B. abortus* and *B. melitensis* following intratracheal infection in mice. *Front. Immunol.* 11;13:959328.

Suárez-Esquivel M, Chaves-Olarte E, Moreno E, Guzmán-Verri C. (2020). *Brucella* Genomics: Macro and Micro Evolution. *Int.J. Mol.Sci.* 21(20):7749. doi: 10.3390/ijms21207749.

Tabatabai, L. B., & Pugh Jr, G. W. (1994). Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu²⁺ Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine*, 12(10), 919-924.

Takamura, S. (2018). Niches for the long-term maintenance of tissue-resident memory T cells. *Front. Immunol.* 9, 1214.

- Tian L, Zhou W, Wu X, Hu Z, Qiu L, Zhang H, Chen X, Zhang S, Lu Z. (2022). CTLs: Killers of intracellular bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 26;12:967679. doi: 10.3389/fcimb.2022.967679.
- Troncoso, I., Rojas, R., Fischer, C., Núñez, C., Arrue, K. (2013). Brucellosis en criaderos caninos: seroprevalencia de 33 casos. *Hosp. Vet.* 5 (2), 50-55.
- Truong, Q. L., Cho, Y., Kim, K., Park, B. K., Hahn, T. W. (2015). Booster vaccination with safe, modified, live-attenuated mutants of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine confers protective immunity against virulent strains of *B. abortus* and *Brucella canis* in BALB/c mice. *Microbiology.* 161(11), 2137-2148.
- Tuemmers, C., Luders, C., Rojas, C., Serri, M., Castillo, C., Espinoza, R. (2013). Detección de *Brucella canis* por método de inmunocromatografía en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco, Chile, 2011. *Rev. Chilena. Infectol.* 30(4), 395- 401.
- Valle-Noguera, A., Ochoa-Ramos, A., Gomez-Sánchez, M. J., and Cruz-Adalia, A. (2021). Type 3 innate lymphoid cells as regulators of the host-pathogen interaction. *Front.Immunol.*, 12, 748851. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.748851>.

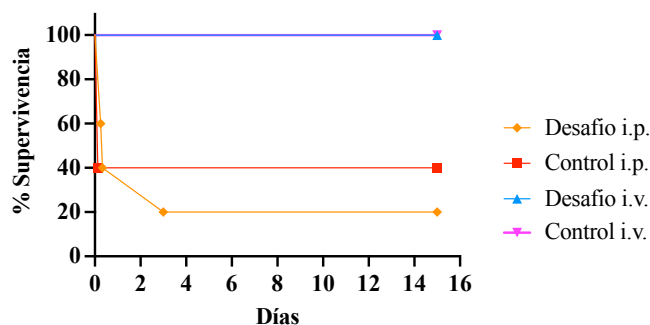
- Van Ginkel, F. W., Nguyen, H. H., and McGhee, J. R. (2000). Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 6(2), 123–132.
- Vorster, J. H., and Mapham, P. H. (2013). Brucellosis and the innate immune system (Part 3). *Continuing Professional Development*, December. https://www.cpdolutions.co.za/Publications/article_uploads/CPD_December_2013.pdf
- Wen J, Li Z, Lv Y, Ding S, Zhu Y, Yang J, Tang J, Zhu M, Zhao Y, Zhao W. (2024). A subunit vaccine based on *Brucella* rBP26 induces Th1 immune responses and M1 macrophage activation. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* 25;56(6):879-891. doi: 10.3724/abbs.2024023.
- Whatmore, A. M. (2009). Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 9(6), 1168-1184.
- Whatmore, A. M., and Foster, J. T. (2021). Emerging diversity and ongoing expansion of the genus *Brucella*. *Infect. Genet. Evol.* 92, 104865.
- Wibroe PP, Helvig SY, Moein Moghimi S. (2014). The Role of Complement in Antibody Therapy for Infectious Diseases. *Microbiol Spectr.* 2(2). doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0015-2014.

- Woods, G. (2024). *Brucella canis*: a clinical review and rationalising risk. In Practice, 46(3), 118-129.
- Wu HY, Abdu S, Stinson D, Russell MW. (2000). Generation of female genital tract antibody responses by local or central (common) mucosal immunization. Infect. Immun. 68(10):5539-45. doi: 10.1128/IAI.68.10.5539-5545.2000.
- Yang Z, Zhao Q, Gao YA, Zhang W. (2016). Combined Oral and Intravenous Immunization Stimulates Strong IgA Responses in Both Systemic and Mucosal Compartments. PLoS One. 9;11(12):e0168037. doi: 10.1371/journal.pone.0168037.
- Yang, Z., Chai, Z., Wang, X., Zhang, Z., Zhang, F., Kang, F., *et al.* (2024). Comparative genomic analysis provides insights into the genetic diversity and pathogenicity of the genus *Brucella*. Front. Microbiol. 15, 1389859.
- Zaldívar-Ochoa, M. (2002). El sistema inmunológico de las mucosas. Rev. Cubana Med. Gen. Integr. 18(5), 352–354.
- Zheng, R., Xie, S., Zhang, Q., Cao, L., Niyazi, L., Lu, S., Sun, X., Zhou, L., Zhang, Y., and Wang, K. (2019). Circulating Th1, Th2, Th17, Treg, and PD-1 levels in patients with brucellosis. J. Immunol. Res. (1). 3783209. <https://doi.org/10.1155/2019/3783209>.

Zhu, J., Larson, C. B., Ramaker, M. A., Quandt, K., Wendte, J. M., Ku, K. P.,
et al. (2011). Characterization of recombinant *B. abortus* strain
RB51SOD toward understanding the uncorrelated innate and adaptive
immune responses induced by RB51SOD compared to its parent vaccine
strain RB51. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1, 10.

ANEXOS

Porcentaje de supervivencia



Anexo 3.4. Curva de Kaplan-Meier de ratones BALB/c tras desafío con cepa RM6/66.

Cada grupo experimental consistió en 5 ratones. El grupo vacunado por vía intraperitoneal (i.p.) y desafiado por la misma vía mostró la mayor mortalidad post desafío, con un patrón de fallecimientos gradual: 2 ratones murieron a las 6 horas, 1 ratón a las 8 horas y otro a los 3 días. En el grupo control que recibió PBS por vía i.p. y fue desafiado de igual forma, 3 ratones fallecieron a las 3 horas. En contraste, ni en el grupo vacunado por vía intranasal (i.n.) ni en su grupo control con PBS se registraron fallecimientos.