

# Revista Electrónica Nueva Época Veterinaria



- Sensibilidad a los antimicrobianos: *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*
- Vacunología reversa: aplicaciones en el estudio de candidatos vacunales contra *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*
- Entendiendo la cognición canina
- Vacunas de ADN, una alternativa en la medicina veterinaria
- De la parasitología de aves silvestres a la patología de anélidos terrestres
- Linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes: caracterización de la enfermedad
- Actividad antimicrobiana *In vitro* del extracto crudo de las hojas de *Eucalyptus globulus* y *Aloe vera barbadensis* sobre *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis subclínica



# DIRECTORIO

## FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

### DIRECTORIO INTERNO

Dr. en TIE. Desiderio Rodríguez Velázquez  
*Director*

Dr. en CARN. Jorge Antonio Varela Guerrero  
*Subdirector Académico*

M. en C. Luis Fernando Vega Castillo  
*Subdirector Administrativo*

### COMITÉ EDITORIAL

Dr. en TIE. Desiderio Rodríguez Velázquez  
*Presidente*

Dr. en CARN. Jorge Antonio Varela Guerrero  
*Secretario Ejecutivo*

Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem  
*Secretario Técnico*

M. en C. Félix Salazar García  
*Coordinador de Planeación y Desarrollo Institucional*

Dr. Jorge Acosta Dibarrat  
*Coordinador de Estudios Avanzados*

Dr. Ignacio Domínguez Vara  
*Coordinador de Investigación*

Dr. César Ortega Santana  
*Coordinador del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal*

Dr. José Mauro Victoria Mora  
*Coordinador del Hospital Veterinario Pequeñas Especies*

M. en CARN. Adriana Yolanda Díaz Archundia  
*Coordinadora del Hospital Veterinario Grandes Especies*

---

# EDICIÓN


**REVISTA ELECTRÓNICA NUEVA ÉPOCA VETERINARIA:** Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México. Oficinas de Edición: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Difusión Semestral.

Revista Electrónica Nueva Época Veterinaria, Año 13, No. 2, Julio-Diciembre 2023, es una Publicación semestral editada por la Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario 100 Ote., Colonia Centro, Toluca, Estado de México, C.P. 50000, Tels. (722) 2965548 o 2966382 ext. 107, <http://veterinaria.uaemex.mx/cultura/revista-nueva-%C3%A9pocaveterinaria.html>, [revnevt\\_fmvyz@uaemex.mx](mailto:revnevt_fmvyz@uaemex.mx)

Editor responsable: Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Reserva de Derechos al Uso Exclusivo no. 04-2022-010613202300-102, ISSN 2448-6612 ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, el Cerrillo Piedras Blancas, San Cayetano de Morelos, C. P. 50090, Toluca, Estado de México. Fecha de modificación: diciembre de 2024.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Se autoriza la reproducción total o parcial del contenido aquí publicado sin fines de lucro, siempre y cuando no se modifique, se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

Hecho en México, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMEX).

 Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No-Comercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.

## COMITÉ DE ARBITRAJE

Dra. Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour  
Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem  
Dr. Martín Talavera Rojas  
Dr. Rafael Cano Torres  
Dra. María Antonia Mariezcurrena Berasain  
Dr. Desiderio Rodríguez Velázquez  
M. en C. Félix Salazar García  
Dra. Celene Salgado Miranda  
Dr. Jorge Acosta Dibarrat

Editor: Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem  
Asistente editorial: PIC. Elizabeth De la Rosa Valdespino

Responsable de la corrección de estilo del idioma inglés  
Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem

Interesados en formar parte del cuerpo de arbitraje, solicitarlo por escrito en formato libre a [revnevt\\_fmvyz@uaemex.mx](mailto:revnevt_fmvyz@uaemex.mx)

---

# CONTENIDO

SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS: <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i>	5
VACUNOLOGÍA REVERSA: APLICACIONES EN EL ESTUDIO DE CANDIDATOS VACUNALES CONTRA <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> , <i>ovis</i>	13
ENTENDIENDO LA COGNICIÓN CANINA	22
VACUNAS DE ADN, UNA ALTERNATIVA EN LA MEDICINA VETERINARIA	29
DE LA PARASITOLOGÍA DE AVES SILVESTRES A LA PATOLOGÍA DE ANÉLIDOS TERRESTRES	35
LINFADENITIS CASEOSA EN PEQUEÑOS RUMIANTES: CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD	39
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i> DEL EXTRACTO CRUDO DE LAS HOJAS DE <i>Eucalyptus globulus</i> Y <i>Aloe vera barbadensis</i> SOBRE <i>Staphylococcus aureus</i> AISLADOS DE VACAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA	46
Bases para la publicación de artículos	51

---

# SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS: *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*

# SENSITIVITY TO ANTIMICROBIALS: *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*

Antúñez-Núñez LD,<sup>1,\*</sup> Montes de Oca-Jiménez R,<sup>1</sup> Velázquez-Ordoñez V,<sup>1</sup> Rodríguez-Domínguez MC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

\* Autor de correspondencia: antunez\_n.l.d@hotmail.com

## RESUMEN

*Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) biovar ovis es un microorganismo patógeno intracelular facultativo responsable de la Linfadenitis caseosa (LC) en pequeños rumiantes que se caracteriza por la presencia de abscesos superficiales y viscerales. El objetivo de este artículo fue realizar una revisión bibliográfica sobre la sensibilidad y resistencia antimicrobiana en aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis. Se revisaron las principales características de la enfermedad, sus factores de resistencia, su sensibilidad y resistencia a diferentes antimicrobianos y las diferentes pruebas utilizadas para *C. pseudotuberculosis*, como el método de microdilución, método de dilución de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), el método de difusión en disco y el método de difusión en agar Mueller-Hinton, así como los inconvenientes en el tratamiento con antibióticos para esta bacteria. Esta revisión de literatura destaca la necesidad de realizar más pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis antes de ser considerado como un tratamiento de primera elección.

**Palabras clave:** *C. pseudotuberculosis*, biovar ovis, sensibilidad, antimicrobianos.

## Abstract

*Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) biovar ovis is a facultative intracellular pathogenic microorganism responsible for Caseous lymphadenitis (CL) in small ruminants that is characterized by the presence of surface and visceral abscesses. The objective of this article was to carry out a bibliographic review on antimicrobial sensitivity and resistance in isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis. The main characteristics of the disease, its resistance factors, its sensitivity and resistance to different antimicrobials and the different tests used for *C. pseudotuberculosis* were reviewed, such as the microdilution method, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dilution method, the disk diffusion and the Mueller-Hinton agar diffusion method, as well as the drawbacks of antibiotic treatment for this bacteria. This literature review highlights the need for further antimicrobial susceptibility testing on *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis isolates before being considered as a first-line treatment.

**Key words:** *C. pseudotuberculosis*, biovar ovis, sensitivity, antimicrobials.

## INTRODUCCIÓN

*Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) biovar *ovis* es una bacteria intracelular facultativa gram positiva (Burkovski, 2018), es un microorganismo patógeno de importancia zoonótica (Heggelund et al., 2015; Fernández et al., 2018) responsable de la Linfadenitis caseosa (LC) que afecta principalmente a los pequeños rumiantes (Arsenault et al., 2003; Williamson, 2001) en diferentes países del mundo (Dorella et al., 2006) y en México (Parise et al., 2018; Varela et al., 2018). *C. pseudotuberculosis* se puede clasificar en dos biovars dependiendo de su capacidad para reducir nitratos (Almeida et al., 2017), el biovar *ovis* que afecta a animales como ovejas y cabras (Varela et al., 2018), y el biovar *equi* que infecta a animales como el caballo (Muñoz et al., 2016). Es un agente patógeno capaz de sobrevivir y crecer en macrófagos, lo que puede ser un factor de escape para el sistema inmunológico del hospedero (McKean et al., 2005; Paton et al., 1994). Una característica importante de este microorganismo en su estructura es la presencia de una pared celular compuesta principalmente por peptidoglicanos, arabinogalactano y ácidos micólicos, y el alto contenido de guaninas y citosinas en su genoma (Guimarães et al., 2011). La terapia de la LC con antibióticos por lo general no se considera efectiva, ya que los antimicrobianos no pueden penetrar las lesiones fuertemente encapsuladas (East, 1998). La ineficacia de la terapia farmacológica se debe a la dificultad que tiene la gran mayoría de los antibióticos para atravesar la membrana de los granulomas, no llegando así a la región donde se encuentran la mayor parte de las bacterias (Dorella et al., 2006; Santos et al., 2016), sin embargo, es una alternativa para disminuir los efectos adversos de la enfermedad en animales de alto valor genético y reproductivo, mediante la administración de antibióticos cuando se diagnostica la infección en fase temprana. El éxito del tratamiento dependerá de la selección del antibiótico apropiado, considerando la farmacocinética, la farmacodinamia y el sitio de la infección (Rhodes et al., 2015). El objetivo de este artículo fue realizar una revisión bibliográfica sobre la sensibilidad y resistencia antimicrobiana en aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Se presenta una breve descripción de la enfermedad por *C. pseudotuberculosis*, su sensibilidad antimicrobiana a diferentes antibióticos reportados, los métodos utilizados y los inconvenientes que se presentan.

## DESCRIPCIÓN BREVE DE LA ENFERMEDAD

La LC se presenta en forma cutánea y visceral, con la formación de abscesos en ganglios linfáticos superficiales palpables a través de la piel y abscesos en órganos importantes como los pulmones, hígado, bazo y riñón (Mahmood et al., 2015; Odhah et al., 2019), causando deterioro en la condición orgánica del animal hacia estados caquéticos de curso crónico (Esteveao et al., 2007), provocando el deterioro en las condiciones físicas de los animales y la disminución de la producción de lana (Paton et al., 1994), carne (Collet et al., 1994) y leche (Schreuder et al., 1990), así como desordenes reproductivos (Faeza et al., 2019). Las lesiones externas aparecen inicialmente como abscesos y más tarde pueden evolucionar a piogranulomas variando en tamaño desde unos milímetros hasta centímetros. Las lesiones viscerales no son detectadas clínicamente, pero se expresarán dependiendo la cantidad, sitio y efecto sobre el órgano involucrado (Santa et al., 2016). Las lesiones en abscesos cutáneos y ganglios linfáticos pueden ser ocasionadas por diferentes especies de microorganismos patógenos, como *C. pseudotuberculosis*, *Staphylococcus coagulans* negativos, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Actinobacillus lignieresis*, *Arcanobacterium pyogenes* y *S. aureus*, entre otros, destacándose el primero por su frecuencia en ovinos y caprinos (Batey, 1986; Andrade et al., 2012).

## FACTORES DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

La resistencia actual de los agentes patógenos a los antimicrobianos constituye un serio problema de salud en todo el mundo y un reto aún mayor para el futuro. Se han realizado investigaciones en diversos países con el objetivo de conocer los mecanismos y causas que hacen posible esta resistencia y la creación de nuevos productos farmacéuticos y naturales para hacerle frente (Serra, 2017). La resistencia bacteriana puede ser natural o intrínseca y adquirida, y debe ser analizada desde varios puntos de vista (farmacocinético, farmacodinámico, poblacional, molecular y clínico) (Calderón y Aguilar, 2016). Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción), a través de cuatro mecanismos (Cabrera et al., 2007): *Transformación*, que consiste en la transferencia o incorporación por una bacteria de ADN libre extracelular procedente de la lisis de otras bacterias (Abreu et al., 2011; Cabrera et al.,

2007; Moreno et al., 2009). *Transducción*, que es la transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infecta a bacterias) (Abreu et al., 2011; Moreno et al., 2009). *Transposición*, movimiento de una sección de ADN (transposón), que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para la expresión de un promotor en particular (Cabrera et al., 2007), y, por último, *Conjugación*, mecanismo que consiste en el intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptor), a través de una hebra sexual o contacto físico entre ambas (Abreu et al., 2011; Cabrera et al., 2007).

Diferentes investigaciones han reportado la resistencia a múltiples fármacos entre las especies del género *Corynebacterium* y recuperadas con poca frecuencia. Se han revisado varios mecanismos de resistencia, como mutaciones en el gen *gyrA* relacionado con la resistencia a quinolonas en *C. striatum*, *C. amycolatum* y *C. macginleyi* (Bernard y Funke, 2012). La presencia del gen *ermX* metilasa se ha relacionado definitivamente con el fenotipo de resistencia macrólido-lincosamida-estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>), expresado como resistencia a eritromicina y clindamicina, y asociado con resistencia a otros agentes antimicrobianos, incluidos cloranfenicol y trimetoprima-sulfametoxazol (Ortiz et al., 2010). Actualmente, existe un reporte sobre la resistencia a la daptomicina en una sola cepa de *C. jeikeium*, sin embargo, no se ha informado resistencia para ninguna cepa del género *Corynebacterium* analizada para linezolid y vancomicina (Bernard y Funke, 2012). Estudios han reportado bacterias corineformes resistentes a la vancomicina o bacterias corineformes con Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) elevados, y se considera inapropiado recomendar glicopéptidos como fármacos de primera línea para el tratamiento de infecciones, ya que algunas bacterias corineformes (por ejemplo: *Microbacterium resistens*) son intrínsecamente resistentes a la vancomicina (Funke y Bernard, 2011). La resistencia a antibióticos aminoglucósidos ha sido comunicada para las corinebacterias (Barberis et al., 2018), algunos estudios sugieren que el biovar *ovis* de *C. pseudotuberculosis*, que infecta a pequeños rumiantes (ovinos y caprinos), es resistente a los aminoglucósidos debido a mecanismos de impermeabilidad y se encuentran relacionados con la incapacidad de producir la enzima nitrato reductasa (Judson y Songer, 1991). Para el género *Corynebacterium* la adquisición y diseminación de resistencias a aminoglucósidos fue relacionada a la presencia de integrones (Schröder et al., 2012). La susceptibilidad a los antimicrobianos de *C. pseudotuberculosis*, descritos en esta revisión, no es predecible con base en la identificación por género

y especie. No hay pautas específicas para estos taxones (CLSI, 2010). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Foro Económico Mundial (FEM), la resistencia a los antibióticos es uno de los mayores problemas de Salud a nivel mundial (Cifuentes et al., 2012; Galán et al., 2014), por lo que se recomienda realizar un estudio exhaustivo de la enfermedad en todas las áreas de producción ovina y caprina del país, y también es importante identificar a las demás bacterias asociadas a la patología (Abebe y Sisay, 2015).

## SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Corynebacterium* *pseudotuberculosis* biovar *ovis*

En un estudio realizado por Muckle y Gyles (1982) sobre la sensibilidad antimicrobiana para el tratamiento de *C. pseudotuberculosis* se informó que todas las cepas que se utilizaron son sensibles a los antibióticos ampicilina, cloranfenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, Bencilpenicilina y sulfametoxazol-trimetoprima, de los cuales, solo tres aislamientos fueron sensibles a la neomicina y todas las cepas fueron resistentes a la estreptomina. En otro estudio realizado por Garg et al., (1985), se informó que las cepas de *C. pseudotuberculosis* son sensibles a la neomicina, pero muy resistentes a la penicilina. Uno de los principales antibióticos utilizados en el tratamiento de la LC es la penicilina, y a pesar de que se han notificado cepas resistentes, aún no está claro el mecanismo de resistencia de *C. pseudotuberculosis* (Baberis et al., 2018; Delgado et al., 2015; Rhodes et al., 2015). Posteriormente, se reportó que de 22 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de abscesos en ovejas y cabras se observó una cepa altamente resistente a la estreptomina (500µg/mL) (Pepin et al., 1989). Estudios han indicado una similitud de los valores de CIM entre las cepas *C. pseudotuberculosis* a los diversos agentes antimicrobianos (Adamson et al., 1985; Costa et al., 1998; Judson y Songer, 1991). Sin embargo, en un estudio de aislamientos de esta bacteria se realizaron pruebas con siete antibióticos mostrando patrones variados de susceptibilidad, presentando sensibilidad a antibióticos como norfloxacin, tetraciclina, doxiciclina HCl y kanamicina, mientras que con antibióticos como ampicilina, clindamicina y doxiciclina HCl se observaron resistencias (Skalka et al., 1989; Connor et al., 2007). En un estudio realizado por Olson et al., (2002) se realizó un cultivo de *C. pseudotuberculosis* como una biopelícula en un intento de reproducir el entorno de una infección natural en donde se observó que esta bacteria es altamente resistente a todos los fármacos

Tabla 1. Reportes de susceptibilidad de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* a diferentes antimicrobianos

Antibióticos	Susceptibilidad	Referencias
Ampicilina	Sensible	Muckle y Gyles, 1982
	Resistente	Skalka et al., 1989; Connor et al., 2007
Cloranfenicol, lincomicina, bencilpenicilina y Sulfametoxazol-trimetoprima	Sensible	Muckle y Gyles, 1982
Gentamicina	Sensible	Muckle y Gyles, 1982; Gallardo et al., 2019
Tetraciclina	Sensible	Muckle y Gyles, 1982; Skalka et al., 1989; Connor et al., 2007; Gallardo et al., 2019
Neomicina	Sensible	Muckle y Gyles, 1982; Garg et al., 1985
Estreptomina	Resistente	Muckle y Gyles, 1982; Pepin et al., 1989
Penicilina	Resistente	Garg et al., 1985
	Sensible	Gallardo et al., 2019
Norfloxacin	Sensible	Skalka et al., 1989; Connor et al., 2007
Clindamicina	Resistente	
Doxiciclina HC1	Sensible, resistente	
Kanamicina	Sensible	
Rifamicina-oxitetraciclina	Sensible	Senturk y Temizel, 2006
Nitrofurantoína, furazolidona y estreptomina	Resistente	Li et al., 2018
Vancomicina	Sensible	Li et al., 2018; Gallardo et al., 2019
Norfloxacin, cefradina, claritromicina, cefepima, amoxicilina, ceftioxitina, levofloxacin y minociclina	Sensible	Li et al., 2018
Cefotaxima, ciprofloxacina y eritromicina	Sensible	Gallardo et al., 2019
Fuente: Elaboración propia.		

que probaron en tales condiciones de crecimiento. Y significativamente, otro informe afirmó el éxito del tratamiento de ovejas infectadas con *C. pseudotuberculosis* con una combinación de los antibióticos rifamicina y oxitetraciclina (Senturk y Temizel, 2006). Un estudio más reciente demostró una alta sensibilidad de los aislados de *C. pseudotuberculosis* a los agentes antimicrobianos comerciales mediante la prueba de difusión en disco, excepto para el antimicrobiano oxacilina, al cual los aislados fueron resistentes (Mattos et al., 2018). Mientras que otro estudio del mismo año reportó aislados de *C. pseudotuberculosis* con sensibilidad a la mayoría de los antibióticos utilizados en el trabajo con tasas de resistencia por debajo del 15%, a excepciones de antibióticos como nitrofurantoína y furazolidona, quienes mostraron resistencia del 100% y estreptomina con resistencia del 18.42%, y en donde antibióticos como vancomicina, norfloxacina, cefradina, claritromicina y cefepima mostraron más sensibilidad a *C. pseudotuberculosis* seguidos de amoxicilina, ceftioxitina, levofloxacin y minociclina (Li et al., 2018). En 2019 un estudio reportó aislamientos de *C. pseudotuberculosis* con sensibilidad a los antibióticos cefotaxima, ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina y vancomicina, en donde

los compuestos más eficaces fueron ciprofloxacina y eritromicina, seguidos por tetraciclina, esto considerando los valores de CIM. En cuanto a los antibióticos gentamicina y penicilina los aislamientos mostraron sensibilidad intermedia (Gallardo et al., 2019) (tabla 1). El patrón de susceptibilidad de *C. pseudotuberculosis* a los agentes antimicrobianos ha variado entre los aislamientos obtenidos de diversas fuentes (Connor et al., 2000; Connor et al., 2007; Foley et al., 2004; Skalka et al., 1989). Por lo que se requieren más estudios antes de que el tratamiento de los casos de Linfadenitis caseosa con antibióticos se convierta en una alternativa viable al sacrificio (Baird, 2006).

## MÉTODOS UTILIZADOS EN SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

A continuación, se describen los métodos *in vitro* utilizados en las pruebas de sensibilidad de *C. pseudotuberculosis* a diferentes antimicrobianos:

## Método de dilución

La CIM se puede realizar por el método epsilométrico, basado en el uso de tiras inertes impregnadas con gradientes de los antibióticos ( $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados se registran a las 24 h y se reafirman a las 48 h. Se interpreta el valor de la CIM en  $\mu\text{g/ml}$ , obtenido de la intersección entre la concentración dada por la tira reactiva y el crecimiento bacteriano que forma una elipse (Gallardo et al., 2019). Los datos se pueden analizar de acuerdo con los criterios establecidos por CLSI para *Corynebacterium* spp. (CLSI, 2016).

## Método de microdilución

Para este método se pueden utilizar suspensiones bacterianas equivalentes a un estándar de McFarland de 0,5 incubadas en caldo Mueller-Hinton ajustado por cationes con 2 a 5% (vol/vol) de sangre lisada a 35 °C a medio ambiente durante un máximo de 48 h (Bernard y Funke, 2012). El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) ha publicado condiciones de prueba y criterios interpretativos para las pruebas de susceptibilidad de *C. pseudotuberculosis* usando un método de microdilución en caldo (CLSI, 2010).

## Método de difusión en disco

Los patrones de sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *C. pseudotuberculosis* se pueden determinar utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Quinn et al., 1994). Se inoculan colonias puras en 5 ml de caldo nutritivo y se incuban a 37 °C durante 24 h hasta que se observó turbidez y posteriormente se comparan con los estándares de 0,5 McFarland. Los aislados deben ser sembrados utilizando un hisopo estéril en agar nutritivo y después los discos impregnados con antibióticos se aplican sobre la superficie de las placas inoculadas con pinzas estériles. Las placas se invierten y se incuban sin la presencia de oxígeno durante 24 h a 37 °C (Abebe y Sisay, 2015).

## Método de difusión en agar

Este método se emplea mediante agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de ovino al 5%, las placas se incuban a 37 °C en atmósfera normal, las lecturas de los halos de inhibición se evalúan a las 24 h y se confirman posteriormente a las 48 h (Estevao et al., 2007; Funke et al., 1997). Para la interpretación de los resultados se pueden utilizar los valores recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para *Staphylococcus* spp., los cuales fueron validados por estudios previos debido a que no hay valores de corte que asignen categorías interpretativas para aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante este método (Funke et al., 1997).

## INCONVENIENTES DEL TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que *C. pseudotuberculosis* es sensible a una gran variedad de antibióticos químicos. En pruebas estándar de laboratorio, se ha demostrado que las clases de antibióticos más utilizadas previenen el crecimiento y la multiplicación de bacterias (Muckle y Gyles, 1982; Judson y Songer, 1991). Sin embargo, aunque *C. pseudotuberculosis* en estudios *in vitro* ha mostrado sensibilidad a una gran variedad de antibióticos (Gallardo et al., 2019), el tratamiento de manera *in vivo* es difícil debido a la naturaleza intracelular de la bacteria (Stefanska et al., 2010) y el contenido grueso, seco y fibroso del absceso (Williamson, 2001; Aleman y Spier, 2002), por lo que es probable que la actividad *in vivo* se limite a fármacos con buena solubilidad lipídica y actividad intracelular, como por ejemplo, macrólidos y fluoroquinolonas (Gallardo et al., 2019). La naturaleza intracelular del microorganismo patógeno durante partes del ciclo de la enfermedad confiere cierta protección frente a ciertos antibióticos comúnmente empleados. Se ha sugerido el tratamiento quirúrgico de las lesiones externas como alternativa al sacrificio en el caso de animales particularmente valiosos (Davis, 1990). Por ejemplo, que la lesión se extirpe de manera quirúrgica y se lave diariamente hasta que cicatrice, y se recomienda un tratamiento antibiótico parenteral durante 4 a 6 semanas para reducir la probabilidad de recurrencia. Sin embargo, este método se considera poco confiable en el mejor de los casos, ya que depende del antibiótico para eliminar todos los microorganismos infecciosos de las lesiones tratadas, sin la presencia de lesiones internas (Rizvi et al., 1997).

## CONCLUSIONES

Esta revisión de literatura destaca la necesidad de realizar más estudios de susceptibilidad antimicrobiana para aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* clínicamente relevantes, ya que la Linfadenitis caseosa representa un gran reto para las unidades de producción de ovinos y caprinos a nivel mundial. Actualmente, se conoce la alta sensibilidad y resistencia de *C. pseudotuberculosis* a los diferentes antibióticos convencionales, sin embargo, es de suma importancia conocer el perfil de actividad de los antibióticos por la gran variabilidad de respuesta que han presentado diferentes aislados de este microorganismo patógeno, antes de considerar a los antimicrobianos como de primera elección para el tratamiento.

## REFERENCIAS

- Abebe, D., Sisay Tessema, T. (2015). Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. *Lett Appl Microbiol*, 61(5):469-76. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12482>.
- Abreu, O., Alpuche, C., Arathoon, E., Arbo, A. (2011). *Tratamiento de las enfermedades infecciosas*. Washington, D.C: OPS.
- Adamson, P.J., Wilson, W.D., Hirsh, D.C., Baggot, J.D., Martin, L.D. (1985). Susceptibility of equine bacterial isolates to antimicrobial agents. *Am J Vet Res*, 46(2):447-50.
- Andrade, J.S.L., Azevedo, S.S., Andreey, J.A.T., Higino, S.S.S., Azevedo, E.O. (2012). Occurrence and risk factors associated with the *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and goats from the semi-arid region of the Paraíba state, Northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32(2):116-120.
- Aleman, M.R., Spier, S.J. (2002). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. En Smith, P.B. (ed.). *Large animal internal medicine*. St. Louis: Mosby Co; pp. 1076-1084.
- Almeida, S., Dorneles, E.M.S., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J., Carneiro, A., Bgano, P., Spier, S., Barh, D., Lage, A., Figueiredo, H., Azevedo, V. (2017). Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC Vet Res*, 13(1): 290. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-017-1210-5>.
- Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J.R., Boisclair, J, Simard, C., Bélanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Canada Preventive Veterinary Medicine*, 59(1-2):67-81.
- Baird, G. (2006). Treatment of ovine caseous lymphadenitis. *Vet Rec*, 159(15):500. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.159.15.500>.
- Barberis, C.M., Sandoval, E., Rodriguez, C.H., Ramírez, M.S., Famiglietti, A., Almuzara, M., Vay, C. (2018). Comparison between disk diffusion and agar dilution methods to determine in vitro susceptibility of *Corynebacterium* spp. clinical isolates and update of their susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist*, (14):246-252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2018.05.009>.
- Batey, R.G. (1986). Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at a Western Australian abattoir. *Am J Vet Res*, 47(2):482-5.
- Bernard, K.A., Funke, G. (2012). Genus *Corynebacterium*. En W.B. Whitman, M. Goodfellow, P. Kampf, H. Busse, M.E. Trujillo, W. Ludwig, K. Suzuki and A. Parte (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 5. New York: Springer, pp. 245-289.
- Burkovski, A. (2018). The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111(5):717-25. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-018-1036-6>.
- Cabrera, C., Gómez, R., Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica del Valle*, 38(2):149-158.
- Calderón, R.G., Aguilar, U.L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica*, LXXIII(621):757-63.
- Cifuentes, M., Silva, F., García, P., Bello, H., Briceño, I., Calvo, M., Labarca, J. (2012). Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012. *Revista Chilena de Infectología*, 31(2):123-30.
- CLSI (2016). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. M45-3rd Edition. Wayne, PA, EE.UU.
- CLSI (2010). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-second edition*. M45-A2, vol 30, no. 18. Wayne, PA.
- Collett, M.G., Bath, G.F., Cameron, C.M. (1994). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. En: Coetzer, J., Thomson, G.R., Justin, R.C. (ed.). *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, pp. 1387-1395.
- Connor, K.M., Fontaine, M.C., Rudge, K., Baird, G.J., Donachie, W. (2007). Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Research*, 38(4):613-623.
- Connor, K.M., Quirie, M.M., Baird, G., Donachie, W. (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 38(7):2633-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.38.7.2633-2637.2000>.
- Costa, L.R., Spier, S.J., Hirsh, D.C. (1998). Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Vet Microbiol*, 62(2):135-43. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00202-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00202-8).

- Davis, E.W. (1990). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in animals. En: B.P. Smith, *Large Animal Internal Medicine*. Ed. C.V. Mosby Company. Toronto. pp. 1120-1126.
- Delgado Duno, A., Zárraga, J., Chirino-Zárraga, C.I., Portillo, C. (2015). Caracterización epidemiológica de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Paraguaná, Venezuela. *Rev Med Vet*, (31):35-45.
- Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res*, 37(2):201-218. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2005056>.
- East, N.E. (1998). Common infectious conditions in proceeding small ruminants for the animal practitioner. En: Western Veterinary Conference. p. 120-112.
- Estevao, B.S., Gallardo, A., Ábalos, A., Díaz, Y., Álvarez, L., Callejo, R., Prieto, M. Jodor, N. Jensen, O. (2007). Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 39(1):44-6.
- Faeza, N.M.N., Jesse, F.F.A., Hambali, I.U., Odhah, M.N., Umer, M., Wessam, M.M.S., Mohd-Azmi, M.L., Wahid, A.H. (2019). Responses of testosterone hormone concentration, semen quality, and its related pro-inflammatory cytokines in bucks following *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its mycolic acid infection. *Trop Anim Health Prod*, 51(7):1855-1866. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-019-01878-2>.
- Fernández, A.M., Reina, G., Rubio, M., Leiva, J. (2018). Infecciones por *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. y *Listeria* spp. *Medicine*, 12(49):2901-9.
- Foley, J.E., Spier, S.J., Mihalyi, J., Drazenovich, N., Leutenegger, C.M. (2004). Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. *Am J Vet Res*, 65(12):1734-7. <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.1734>.
- Funke, G., Bernard, K.A.J., Carroll, K.C., Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. (2011). *Manual of clinical microbiology*. En: Versalovic. Washington, DC: ASM Press.
- Funke, G., von Graevenitz, A., Clarridge J.E., Bernard, K.A. (1997). Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 10(1):125-59. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.10.1.125-159.1997>.
- Galán, J., Borarull, A., Baquero, F. (2014). Impacto de los movimientos migratorios en la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista Española Salud Pública*, (88):829-37.
- Gallardo, A.A., Toledo, R.A., González Pasayo, R.A., Azevedo, V., Robles, C., Paolicchi F.A., Estevao, S.G. (2019). *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*: evaluación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*. *Rev Argent Microbiol*, 51(4):334-338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2018.12.001>.
- Garg, D.N., Nain, S.P.S., Chandiramani, N.K. (1985). Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats. *The Indian Veterinary Journal*, (62):805-8.
- Guimarães, A.S., Carmo, F.B., Heinemann, M.B., Portela, R.W.D., Meyer, R., Lage, A.P., Seyffert, N. Miyosgi, A., Azevedo, V., Gouveia, A.M.G. (2011). High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Vet Res*, 8(7):68. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-7-68>.
- Heggelund, L., Gaustad, P., Håvelsrud, O.E., Blom, J., Borgen, L., Sundset, A., Sørum, H., Frøland, S.S. (2015). *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. *Open Forum Infect Dis*, 2(2):ofv053. <http://dx.doi.org/10.1093/ofid/ofv053>
- Judson, R., Glenn Songer, J. (1991). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: *in vitro* susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Vet Microbiol*, 27(2):145-50. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90005-z](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(91)90005-z).
- Li, H., Yang, H., Zhou, Z., Li, X., Yi, W., Xu, Y., Wang, Z., Hu, S. (2018). Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Rumin Res*, (168):69-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.09.015>.
- Mahmood, Z.K.H., Jesse, F.F., Saharee, A.A., Jasni, S., Yusoff, R., y Wahid, H. (2015). Clinico-pathological changes in goats challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (PLD). *Am J Anim Vet Sci*, 10(3): 112-132. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2015.112.132>.
- Mattos, M. M., Santos, L. M., Portela, R. W., & Araújo, R. P. C. de. (2018). Sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolados de pequenos ruminantes da região Centro-Norte do Estado da Bahia. *Revista De Ciências Médicas E Biológicas*, 17(3), 330-336. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v17i3.28627>.
- Mckean, S., Davies, F., Moore, R. (2005). Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes infect. Paris*, 7(13),1352-1363.
- Moreno, C., González, R., Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista Otorrinolaringología Cirugía Cabeza y Cuello*, (69):185-92.
- Muckle, C.A., Gyles, C.L. (1982). Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Can J Comp Med.*, 46(2):206-208.

Muñoz, B.A.V., Cortés, P.Y.A., Arellano, R.B., Hernández, G.M., Hernández, C.R., Díaz, A.E. (2016). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from muscular abscesses in two horses: First report in Mexico. *Equine Veterinary Education*, 29(8):431-5.

Odhah, M.N., Jesse, F.F.A., Teik, C.E.L., Mahmood, Z., Wahid, H.A., Mohd, L.M.A., y otros. (2019). Clinico-pathological responses and PCR detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. *Microb Pathog*, 135, 103628. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103628>.

Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*, 66(2):86-92.

Ortiz, P.A., Martín, H.N.Z., Esteban, J., Fernández, N.M.I., García, C.J.I., Fernández, R.R. (2010). High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microbial Drug Resistance*, (16):273-277.

Paton, M.W., Rose, I.R., Hart, R.A., Sutherland, S.S., Mercy, A.R., Ellis, T.M., Dhaliwal, J.A. (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust Vet J*, 71(2):47-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb06152.x>.

Parise, D., Parise, M.T.D., Viana, M.V.C., Muñoz-Bucio, A.V., Cortés-Pérez, Y.A., Arellano-Reynoso, B., Díaz-Aparicio, E., Dorella, F.A., Pereira, F.L., Carvalho, A.F., Figueiredo, H.C.P., Ghosh, P., Barh, D. Gomide, A.C.P., Azevedo, V.A.C. (2018). First genome sequencing and comparative analyses of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains from Mexico. *Stand Genomic Sci*, 13(1):21. <http://dx.doi.org/10.1186/s40793-018-0325-z>.

Pépin, M., Boisramé, A., Marly, J. (1989). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. *Ann Rech Vet*, 20(1):111-115.

Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby International Limited.

Rhodes, D.M., Magdesian, K.G., Byrne, B.A., Kass, P.H., Edman, J., Spier, S.J. (2015). Minimum inhibitory concentrations of equine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates (1996-2012). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(1):327-332.

Rizvi, S., Green, L.E., Glover, M.J. (1997). Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Veterinary Record*, 140(22):586-7.

Santana, J.K.T.O., Santos, T.M., Tartaglia, N.R., Aguiar, E.L., Souza, R.F.S., Mariutti, R.B., Eberle, R.J., Arni, R.K., Portela, R.W., Meyer, R., Azevedo, V. (2016). Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. *Microb Cell Fact*, (15):83.

Santos, E.M.S. (2016). Antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* com potencial promissor para o desenvolvimento de vacinas contra linfadenite caseosa: uma revisão de literatura. *Cad Ciênc Agrá*, 8(2):90-99.

Schröder, J., Maus, I., Meyer, K., Wördemann, S., Blom, J., Jaenicke S., Schneider, J., Trost, E., Tauch, A. (2012). Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics*, 13(1):141. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-13-141>.

Senturk, S., Temizel, M. (2006). Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. *Veterinary Record*, (159):216-7.

Schreuder, B.E., Ter Laak, E.A., De Gee, A.L. (1990). *Corynebacterium pseudotuberculosis* in milk of CL affected goats. *Vet Rec.*, 127(15):387.

Serra, V.M.A. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3):402-19.

Skalka, B., Literak, I., Michalik, I., Skrivanek, M. (1989). *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, (45):31-5.

Stefańska, I., Gieryńska, M., Rzewuska, M., Binek, M. (2010). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Pol J Vet Sci*, 13(1):143-9.

Varela, G.J.A., Montes De Oca, J.R., Acosta, D.J., Hernández, L.F., Morales, E.V., Monroy, S.H.G. (2018). Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in México. *Microbial Pathogenesis*, (117):304-9.

Williamson, L.H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 17(2):359-71, vii. [http://dx.doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30033-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30033-5).

# VACUNOLOGÍA REVERSA: APLICACIONES EN EL ESTUDIO DE CANDIDATOS VACUNALES CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*

## REVERSE VACCINOLOGY: APPLICATIONS IN VACCINE CANDIDATES AGAINST *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*

Nango-Lechuga MJ,<sup>1</sup> Rodríguez-Domínguez MC,<sup>1\*</sup> Velázquez-Ordoñez V,<sup>1</sup>  
Montes de Oca-Jiménez R,<sup>1</sup> Tenorio-Borroto E<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

\* Autor de correspondencia: mariacarlarodriguezdominquez@gmail.com

### RESUMEN

La bioinformática ha emergido como un campo importante que actúa como una intersección entre la biología experimental y los enfoques computacionales. Una de las aplicaciones que se ha derivado de esta área es la vacunología reversa, la cual analiza el genoma o las secuencias de aminoácidos con el objetivo de identificar proteínas o péptidos con potencial inmunogénico. Estas herramientas bioinformáticas representan una ventaja, ya que permiten obtener resultados basados en el uso de programas predictivos, antes de evaluar experimentalmente posibles candidatos vacunales. La vacunología reversa ha sido utilizada en el estudio de las características moleculares de la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, agente causal de la Linfadenitis caseosa, enfermedad de importancia mundial para la producción de pequeños rumiantes y la salud pública por considerarse una zoonosis. El presente trabajo pretende establecer diferentes técnicas bioinformáticas que se han utilizado para estudios de vacunología reversa y sus aplicaciones en el análisis de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, destacando su uso en el diseño de vacunas contra la Linfadenitis caseosa.

**Palabras clave:** Bioinformática, vacunología reversa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Linfadenitis Caseosa.

### Abstract

Bioinformatics has emerged as an important field that acts as an intersection between experimental biology and computational approaches. One of the applications that has been derived from this area is Reverse vaccinology. This analyzes the genome or amino acid sequences to identify proteins or peptides with immunogenic potential. These bioinformatic tools represent an advantage since they allow obtaining results based on the use of predictive programs before experimentally evaluating possible vaccine candidates. Different tools have been used in the study of the molecular characteristics of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, a bacterium that causes Caseous Lymphadenitis, a worldwide disease that affects small ruminants and public health as it is considered a zoonosis. The present work aims to establish the different bioinformatic techniques that have been used in the analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, highlighting their use in the design of vaccines against Caseous Lymphadenitis.

**Key words:** Bioinformatics, reverse vaccinology, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caseous Lymphadenitis.

## INTRODUCCIÓN

Las herramientas bioinformáticas son ampliamente utilizadas para caracterizar a las moléculas posibles candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas, evitando el uso de animales de experimentación en las primeras etapas del diseño, así como logrando un ahorro significativo en tiempo y gastos de la investigación (Zaharieva et al., 2017; Araújo et al., 2019; Ong et al., 2020).

Los estudios de vacunología reversa se enfocan en el análisis *in silico* primero del genoma usando predictores genéticos y luego del análisis de las características de cada proteína por separado (Goodswen et al., 2014; Flower et al., 2015). Estas estrategias fueron utilizadas por primera vez en la predicción de antígenos para el desarrollo de una vacuna contra *Meningococcus* serogrupo B (Christensen et al., 2013).

Los criterios de selección de posibles antígenos para el diseño de vacunas varían en dependencia del patógeno. Para la identificación de proteínas con potencial inmunogénico se deben tener en cuenta las características y propiedades que influyen de manera positiva en la activación del sistema inmune. Existen diferentes tipos de programas que permiten la identificación y predicción de características como estructura, adherencia, fusión, antigenicidad, unión a MHC clase I y II, secuencias de unión a proteosomas, así como activadores de linfocitos B y T. La localización celular es una de las características para tener en cuenta, ya que la mayoría de las proteínas antigénicas son aquellas que están más expuestas en el hospedero y pueden ser rápidamente reconocidas por el sistema inmune, como proteínas secretadas, proteínas expuestas a la superficie o proteínas de membrana (Dalsass et al., 2019). La capacidad de unión y presentación en el contexto MHC clase I y II permite identificar qué tipo de respuesta inmune estará favorecida. Los factores de virulencia son los principales candidatos y a menudo los genes que los codifican se encuentran en islas de patogenicidad compartidas y conservadas por diversas cepas. La obtención de resultados satisfactorios depende de la precisión en la predicción de antígenos y para ello existen diversos programas informáticos que facilitan este proceso (Doytchinova y Flower, 2007; Chandra et al., 2010; Droppa-Almeida et al., 2018).

Algunos de estos programas bioinformáticos se han aplicado en el estudio *in silico* de antígenos vacunales contra *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* (Droppa-Almeida et al., 2018; Araujo et al., 2019), bacteria agente causal de la Linfadenitis Caseosa, enfermedad que afecta a pequeños rumiantes (Mahmood et al., 2015; Odhah et al., 2019), ocasionando importantes pérdidas económicas relacionadas con

desordenes reproductivos, el decomiso de las vísceras, rechazo de pieles y lana.

Actualmente existen vacunas comerciales disponibles para el control de esta enfermedad, cuya protección está asociada a la producción de anticuerpos anti-exotoxina PLD fundamentalmente, los cuales protegen contra el daño tisular y la diseminación del microorganismo; sin embargo, es una protección parcial, ya que estas vacunas aún son deficientes en eliminar las bacterias intracelulares (Bastos et al., 2012; de Pihno et al., 2021). Por tales motivos diferentes grupos de investigadores trabajan en el desarrollo de vacunas experimentales que permitan una protección completa y eficaz. En este sentido, la vacunología reversa desempeña un papel principal en la selección de nuevos antígenos como posibles candidatos vacunales.

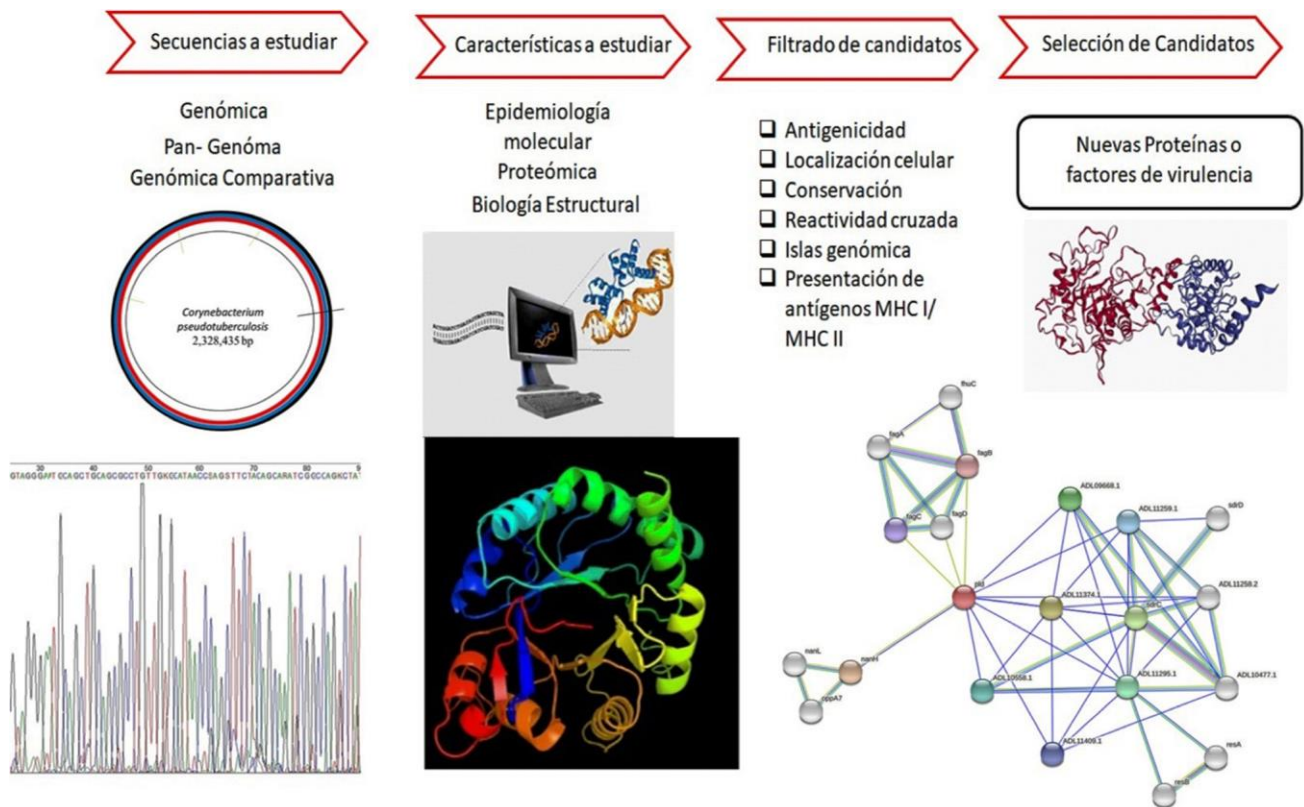
El presente artículo tiene como objetivo indagar sobre el uso de diferentes programas bioinformáticos en el estudio de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la identificación y desarrollo de nuevas vacunas experimentales.

## Vacunología Reversa

Uno de los enfoques más dinámicos de la biotecnología es la vacunología reversa (VR), que desempeña un papel importante en el desarrollo de las vacunas actuales. La VR utiliza herramientas informáticas, como la inteligencia artificial, el auto-aprendizaje y datos ómicos, para el estudio primero del genoma, luego el análisis de las moléculas posibles candidatos en base a sus características físico-químicas, y por último, la comparación de estas con resultados disponibles en las bases de datos, con la integración de la información mediante el uso de programas que estiman los antígenos que tendrán mayor efectividad en una formulación vacunal (Soria-Guerra et al., 2015). El primer enfoque exitoso de vacunología reversa se observó en el estudio de candidatos vacunales para *Meningococcus* serogrupo B (Christensen et al., 2013), lo cual revolucionó todo el campo de la biología computacional.

La aplicación de tecnologías genómicas en la investigación de vacunas mediante el uso de la VR representó un gran avance para el proceso de descubrimiento de nuevas vacunas. Al determinar todo el repertorio genómico de un agente patógeno, los investigadores pudieron identificar objetivos protectores y diseñar vacunas eficaces donde los enfoques convencionales habían fallado (Pereira et al., 2020). Para el estudio de candidatos vacunales mediante VR se consideran primeramente los estudios de genómica, luego con las secuencias objeto de estudios se pueden aplicar enfoques epidemiológicos, proteómicos o estructurales y por último se utilizan algoritmos computacionales que

Figura 1. Esquema de pasos en el estudio de vacunología reversa



Enfocados primero en el análisis in silico del genoma usando predictores genéticos (A), luego el proteoma (B) y finalmente el análisis de las características de cada proteína por separado (C, D).  
Fuente: Elaboración propia.

facilitan la predicción de características específicas de los antígenos posibles candidatos vacunales (figura 1).

El uso de VR inició una cascada de cambios que afectaron todo el proceso de desarrollo de vacunas, cambiando el enfoque de la identificación de una lista de vacunas candidatas a la definición de un conjunto de pantallas de alto rendimiento para reducir la necesidad de pruebas costosas y laboriosas en modelos animales (Dalsass et al., 2019). Una comprensión profunda de la epidemiología de las vacunas candidatas, y su regulación y papel en las interacciones hospedero-patógeno, debe convertirse en un componente integral del flujo de trabajo de detección. Lejos de estar obsoleto por los avances tecnológicos, la VR aún representa un paradigma de cómo las tecnologías de alto rendimiento y el conocimiento científico pueden integrarse en la investigación biotecnológica.

### Programas Bioinformáticos de análisis de VR

Los programas de VR pueden ser de dos tipos, de acuerdo con sus enfoques algorítmicos. Los de tipo de árbol de decisiones o “filtrado” y los de aprendizaje computacional automático o “clasificatorios”. Los programas de tipo de árbol de decisiones o filtrado se basan en diagramas de flujo donde las secuencias

de las proteínas del patógeno se evalúan ante una serie de condiciones o filtros hasta un subconjunto donde se identifican como posibles candidatos para la vacuna. Los filtros corresponden a características de las proteínas que se puede medir directamente, como el peso molecular, o características predichas por un programa computacional, como la localización sub-celular o la probabilidad de ser una proteína de adhesión. La desventaja con los programas que utilizan este tipo de algoritmo es que en cada paso de clasificación van eliminando posibles candidatos (Michalik et al., 2016). Los programas de aprendizaje computacional automático o “clasificatorios” utilizan enfoques o modelos estocásticos como máquinas de vectores de soporte, redes neuronales artificiales o modelos ocultos de Markov, para predecir la calidad de unión o enlace de la secuencia en estudio. Estos enfoques intentan refinar el modelo de predicción ajustando parámetros teniendo en cuenta la información de secuencias posibles candidatos o no, proporcionadas por una colección conocida que se emplea para entrenar el modelo. Estas aplicaciones de aprendizaje automático no descartan proteínas, como las herramientas de árbol de decisión, clasificando todo el conjunto de proteínas de entrada por su probabilidad de ser un candidato vacunal. Esto resulta muy útil para los ensayos confirmatorios preclí-

nicos, ya que se puede comenzar con los candidatos más prometedores clasificados en las primeras posiciones. Las herramientas de aprendizaje automático difieren entre sí del tipo de algoritmo de clasificación, por la cantidad de características que miden y el tamaño y variedad de proteínas que constituyen el conjunto de entrenamiento (Michalik et al., 2016).

las cadenas o secuencias de aminoácidos que conforman la proteína son convertidas en vectores uniformes a través de covarianza cruzada automática. Las variables relevantes son seleccionadas por algoritmo genético o por etapas de regresión y finalmente clasifican a la proteína como antígeno protector o no, mediante análisis basado en el cálculo de mínimos

Cuadro 1. Programas basados en algoritmos de Árbol de decisión o Aprendizaje automático, ventajas y desventajas

Programa	Tipo de Algoritmo	Criterio de selección	Ventaja	Desventaja
Nerve	Árbol de decisión	Sin proteína citoplasmática <2 hélices transmembrana Alta probabilidad de adhesina Sin homología con proteínas humanas	Los datos de entrada y salida son automáticamente estructurados en base de datos	No actualizado
Vaxijen	Aprendizaje automático (Machine-learning)	Probabilidad de resultados por encima del valor de corte establecido a (0.5)	Interfaz gráfica muy rápida	Conjuntos de datos de entrenamiento fijos (100 antígenos bacterianos conocidos, 100 no antígenos)
Vaxign	Árbol de decisión	Sin proteína citoplasmática <2 hélices transmembrana Alta probabilidad de adhesina Sin homología con humanos y proteínas de ratón	Mantenimiento regular Fácil de usar e intuitivo	La descarga de los resultados es limitada a 500 proteínas
Jenner-predict	Árbol de decisión	Sin proteína citoplasmática <2 hélices transmembrana Presencia de dominios Pfam involucrados en la interacción huésped-patógeno y Patogénesis	Carga y descarga de grandes conjuntos de datos	A veces no disponible
VacSol	Árbol de decisión	Sin proteína citoplasmática <2 hélices transmembrana Sin homología con proteínas humanas, Gen esencial Factor de virulencia	Interface fácil de usar	Resultados restrictivos
Bowman-Heinson	Aprendizaje automático (Machine-learning)	Probabilidad de resultados por encima del valor de corte establecido a (0.5)	Conjunto de entrenamiento más grande (200 antígenos bacterianos conocidos, 200 supuestos no antígenos)	Herramientas de anotación para eucariotas

Fuente: Elaboración propia.

El programa VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen>) fue la primera herramienta bioinformática confiable para la predicción de proteínas con capacidad antigénica en bacterias, virus, células tumorales y posteriormente parásitos y hongos (Doytchinova y Flower, 2007; Doytchinova y Flower, 2008). El programa es entrenado con múltiples secuencias conocidas de antígenos inmunoprotectores y no protectores, que sirven como referencia para la predicción. La página de resultados informa la probabilidad de que la proteína (como una fracción de unidad) sea antigénica o no (antígeno probable o antígeno no probable). El programa tiene en cuenta tres propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que componen la proteína como hidrofobicidad, tamaño molecular y la polaridad. A cada propiedad de los aminoácidos se le asigna una variable z, y luego

cuadrados parciales (Zaharieva et al., 2017). Para la predicción de proteínas antigénicas de origen bacteriano presenta un 80% de precisión, 79% sensibilidad y 81% de especificidad (Doytchinova y Flower, 2007). El programa considera a partir del valor de score (corte) fijado, en adelante, que la proteína presenta actividad antigénica. Esta herramienta ha sido empleada en investigaciones veterinarias en la detección de antígenos para el diseño de vacunas contra *Brucella spp.*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Pajaroellobacter abortibovis*, *Leptospira interrogans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Anaplasma marginale* y *C. pseudotuberculosis* (Zaharieva et al., 2017).

Las herramientas para identificar epítomos de células B se dividen en aquellas que dependen de la información de la estructura primaria e identifican epítomos continuos, lineales, así como las que dependen de información

de la estructura secundaria y predicen epítomos discontinuos o estructurales. El primer grupo de herramientas realiza la predicción teniendo en cuenta un conjunto de descriptores como atributos fisicoquímicos, accesibilidad superficial y composición de aminoácidos. En general rinden precisión para epítomos continuos (lineales), pero son menos eficientes en la identificación de epítomos discontinuos. Para superar esta deficiencia se han incorporado a los programas cálculos de predicción incluyendo información de estructura secundaria, accesibilidad de superficie calculada y/o índices de protuberancia, además de información sobre la estructura tridimensional de la proteína y la estructura de complejos receptor-antígeno conocidos. Ejemplos de herramientas basadas en secuencias lineales son BepiPred, ABCpred, BEST y para la predicción basada en estructura se utilizan programas como BepiPred 2.0, ElliPro, Paratome, PEPOP y BEEPro (Soria-Guerra et al., 2015; Michalik et al., 2016; Zaharieva et al., 2017; Jespersen et al., 2017).

Existen interfaces web que permiten realizar pruebas exhaustivas de sus predicciones y análisis en función de sus bases de datos. La página web IEDB (por sus siglas en inglés, *Immune Epitope Database and Analysis Resource*) proporciona una compilación actualizada regularmente, de epítomos vinculantes y sus afinidades. Constituye una herramienta de predicción accesible a través de una única intuitiva interfaz web, que incorpora diferentes programas y algoritmos para la caracterización general de una proteína o secuencia (Fleri et al., 2017). Las he-

rramientas disponibles se clasifican en dos categorías: de análisis y predicción. Las herramientas de análisis incluyen agrupación de epítomos, conservación de secuencias y más, mientras que las de predicción cubren la unión a epítomo de células T y B, la inmunogenicidad y las estructuras TCR/BCR. Permite la identificación de epítomos antigénicos, con mayor probabilidad de exposición a superficie, de unión a anticuerpos, de unión a MHC I y MHC II para activación de células T. Además de estas herramientas, también se conecta con diferentes servidores que permiten una comparación de los resultados, lo cual mejora el rendimiento de la aplicación (Dhanda et al., 2019; Martini et al., 2020).

Vaxign es un sitio web diseñado para la predicción de moléculas con potencial inmunogénico basados en secuencias de genomas. Fue evaluado y estandarizado para la predicción de candidatos a vacunas contra *Escherichia coli* uropatógena (He et al., 2010). El programa emite un criterio en función de la evaluación de diversas propiedades de la proteína. Vaxign predice la ubicación subcelular de la proteína, la presencia de hélices de transmembrana, probabilidad de adhesión, secuencias conservadas en proteínas de humanos y/o proteínas de ratón, secuencia de exclusión en el genoma de cepas no patógenas y epítomos que se unen a MHC clase I y clase II. También realiza la predicción basada en el previo entrenamiento con otras secuencias. La base de datos pre-calculada de Vaxign contiene predicciones de vacunas para más de 70 genomas (Ong et al., 2020).

Cuadro 2. Criterios de selección de candidatos vacunales en función de las características de las proteínas

Características de las proteínas	Programas	NERVE	Vaxign	Jener-predict	VacSol	Bowman-Heinson
Localización subcelular	Psortb	x	x	x	x	
	TargetP					x
Dominios de Transmembranas	HMMTOP	x	x	x	x	
Dominios patogénicos o factores de virulencia	SPAAN	x	x			
	Pfam			x		
	VFDB				x	
Similitud con proteínas del hospedero	LipoP					x
	BLASTp / MHCPEP db	x				
	BLASTp / RefSeq / Swiss Protodb				x	
Respuesta de células B-T	OrthoMCL		x			
	NetMhc					x
	Vaxitope		x			
	ABCpred				x	
	ProPred -1				x	
	ProPred				x	
	GPS-MBA					x
PickPocket					x	

Modificación post-traducciona	YinOYang (glicosilación)					x
	NetPhosK (fosforilación)					x
	ProP (cortes en proteínas, autoproteasas)					x

Fuente: Elaboración propia.

Para la identificación de proteínas con potencial inmunogénico se deben tener en cuenta las características y propiedades que influyen de manera positiva en la activación del sistema inmune.

Existen diferentes tipos de programas que permiten la identificación y predicción de características como estructura, adherencia, fusión, antigenicidad, unión a MHC clase I y II, secuencias de unión a proteosomas, así como activadores de linfocitos B y T. En el cuadro 2 se muestran algunos de los criterios de selección de candidatos vacunales en función de diferentes características de las proteínas.

Un estudio comparativo entre los programas NERVE, Vaxign, VaxiJen, Jenner-predict, Bowman-Heninson, y VacSol, para la identificación de antígenos bacterianos protectores (ABP) con capacidad conocida, permitió establecer que ninguno de los programas fue capaz de identificar al 100% el mismo conjunto de antígenos ABP probados. Las listas de proteínas candidatas establecidas por cada programa no fue similar, ya que estos sugieren los posibles candidatos de acuerdo con diferentes algoritmos o patrones de selección (Dalsass et al., 2019). Estos resultados indican que se requiere de una mejora en la precisión de las herramientas bioinformáticas existentes, con el apoyo de la expansión de las bases de datos y la incorporación de datos negativos provenientes de evaluaciones experimentales. También sugiere que la combinación de diferentes programas predictivos puede ampliar el rango de moléculas a considerar posibles candidatos, y que aquellas que sean clasificadas por diferentes algoritmos tienen mayor probabilidad de ser las más inmunogénicas.

### Vacunología reversa para *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Numerosos estudios de vacunología reversa se han realizado para la predicción de antígenos inmunogénicos de *C. pseudotuberculosis*. El estudio *in silico* del pan-exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* se realizó con las cepas 1002, C231, I19, FRC41 y PAT10 (Santos et al., 2012). En este trabajo se aplicó la vacunología reversa para analizar la secuencia del pan-genoma y la identificación de genes expresados en el ciclo de vida del patógeno. Todos los marcos de lectura abiertos (ORF) derivados de las secuencias del genoma se evaluaron usando un programa computacional para determinar su habilidad como

candidatos a vacunas, prestando especial atención a los que codifican proteínas exportadas, ya que son esenciales en las interacciones hospedero-patógeno (Santos et al., 2012).

Otro análisis de VR con los programas Surf+ y Vaxign se realizó para predecir nuevos antígenos que pueden ser empleados en el desarrollo de una vacuna con ambos tipos de biovar *ovis* y *equi* (Soares et al., 2013a). Este mismo grupo de investigadores realizó el estudio del pan-genoma de 15 cepas aisladas de hospederos y orígenes geográficos diferentes. El pan genoma se compone de tres partes: genoma central, genoma accesorio y genes específicos de cepa. El genoma central está compuesto por genes que comparten todas las cepas analizadas en el estudio. Por lo general, los genes centrales codifican productos que son responsables de los aspectos básicos de la vida del organismo, como los procesos de replicación, transcripción, traducción y mantenimiento de homeostasis celular, haciéndolos objetivos adecuados para el desarrollo de vacunas (Rouli et al., 2015). Los resultados del trabajo revelaron estrechas relaciones entre las diferentes cepas de corinebacterias evaluadas, el comportamiento clonal de *C. pseudotuberculosis* y aumentos lentos en el tamaño de los pan-genomas (Soares et al., 2013b).

Diferentes proteínas identificadas como posibles factores de virulencia SpaC, SodC, NanH y PknG han sido analizadas usando inmunoinformática, con el programa VaxiJen. En el trabajo de Santana y colaboradores se descubrió que SpaC, PknG y NanH presentan mejor potencial para el desarrollo de una vacuna que SodC (Santana-Jorge et al., 2016).

Mediante un análisis de predicción de epítomos con la página web IEDB se determinaron posibles secuencias de la proteína CP40, que pueden ser reconocidas con mayor eficiencia por los anticuerpos. En este trabajo de un total de 184 epítomos evaluados se identificaron 6 péptidos con mayor potencial inmunogénico. También en este estudio se determinaron las interacciones que se producen entre la proteína CP40 con el receptor tipo Toll (TLR-2). Estos receptores forman parte del sistema inmune innato, son moléculas de membrana que participan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), activando el sistema inmune. Estos receptores inducen la activación del factor de transcripción nuclear B (NF- $\kappa$ B), lo cual favorece el desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria y la proliferación de leuco-

citós de linaje mielóide. Los TLR también aumentan la producción de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40, que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígenos, siendo necesarias para la activación de Linfocitos T por parte de las células dendríticas y macrófagos. Se demostró que los 6 péptidos con potencial inmunoestimulante son capaces de interactuar con el receptor TLR2. Este estudio *in silico* plantea el potencial que presenta la proteína CP40 para interactuar con el receptor TLR2, lo que le confiere capacidad para activar la respuesta inmune celular (Droppa-Almeida et al., 2018).

Otro análisis de VR permitió identificar las características inmunoprotectoras de proteínas que se activan para la defensa de *C. pseudotuberculosis* ante condiciones de estrés ambiental. Mediante el empleo de los programas Vaxign y VaxiJen se identificaron la localización celular (membrana citoplasmática) y la capacidad antigénica (a partir de 0.4) de las proteínas CopC de resistencia a cobre (copC= antigénica=0.85), YkuE metalofosfoesterasa (ykuE=0.40), NADH deshidrogenasa (ndh=0.48), MtrB sensor histidina quinasa (mtrB=0.54), FtsL proteína de unión a penicilina (ftsL=0.64), SenX3 histidina-quinasa de transducción de señales senX3=0.61) (Araújo et al., 2019).

La influencia de diferentes condiciones de estrés (alto contenido de hierro, bajo contenido de hierro, ósmosis y pH) se evaluaron en la expresión de los genes en *C. pseudotuberculosis*. Utilizando redes de co-expresión para la identificación de genes causales basado en datos de secuencia de ARN-seg, mediante un algoritmo de inferencia de red consenso llamado miRsig y la herramienta miRinfluence, se identificaron los genes causales o influyentes de la red. Los resultados indicaron que más del 50% de los genes identificados como influyentes están involucrados en funciones celulares. Por otra parte, en la mayoría de las cepas analizadas, los genes causales tienen roles en procesos asociados con la respuesta a tensiones extracelulares, patogenicidad, componentes de la membrana y genes esenciales (Franco et al., 2020).

La antigénica, el potencial alérgico, la predicción de los epítos B, la unión a los receptores MHC y el acoplamiento en el receptor Toll-Like 2 fueron propiedades evaluadas *in silico* para la proteína de fusión PLD-CP40-maltosa. El análisis *in silico* demostró que PLD-CP40-maltosa tiene potencial inmunogénico, no tiene propiedades alérgicas y puede acoplarse al receptor TLR2 (Barral et al., 2022).

## CONCLUSIONES

Las vacunas tienen un impacto significativo en la salud pública y en la salud animal, y la vacunología en la era de la bioinformática está aprovechando las nuevas tecnologías para abordar enfermedades para las que el desarrollo de vacunas no ha tenido éxito hasta la fecha. La mayoría de las vacunas que existen disponibles en el mercado fueron desarrolladas sobre la base de métodos vacunales tradicionales, que se basaban en la detección empírica de unos pocos candidatos a la vez, en función de las características conocidas del patógeno. Sin embargo, la capacidad de secuenciar el genoma de un patógeno proporciona acceso a todo su repertorio antigénico, catalizando un cambio en el desarrollo de vacunas hacia enfoques de “vacunología reversa” basados en el análisis *in silico* de genes que codifican proteínas con los atributos de buenos objetivos de vacunas. Además, la creciente disponibilidad de secuencias genómicas ha llevado al desarrollo y la aplicación de tecnologías adicionales para el descubrimiento de vacunas, incluidas la genómica comparativa, la transcriptómica, la proteómica, la inmunómica y la genómica estructural. Candidatos vacunales identificados a partir del genoma o proteoma de un patógeno pueden expresarse luego como proteínas recombinantes y analizarse siguiendo métodos *in vitro* o modelos *in vivo* para evaluar la inmunogenicidad y la protección. En esta revisión le presentamos un resumen de diferentes programas utilizados en la vacunología reversa, y su enfoque en el estudio de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, desde la identificación de diferentes características de las moléculas que permiten su análisis como candidatos con potencial inmunogénico, explorado las ventajas, limitaciones y elementos necesarios de este enfoque.

## REFERENCIAS

- Araújo, C.L., Alvesa, J., Nogueira, W., Pereira, L.C., Gomide, A.C., Ramosa, R., Azevedo, V., Silva, A., Folador, A. (2019). Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. *Gene*, (702):36-45. doi: 10.1016/j.gene.2019.03.049.
- Barral, T.D., Kalil, M.A., Mariutti, R.B., Arni, R.K., Gismene, C., Sousa, F.S., Collares, T., Seixas, F.K., Borsuk, S., Estrela-Lima, A., Azevedo, V., Meyer, R., Portela, R.W. (2022). Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP: PLD: CP40 fusion protein. *Appl Microbiol Biotechnol*.1-17. doi: 10.1007/s00253-022-12279-1.
- Bastos, B.L., Dias, P.R.W., Dorella, F.A., Ribeiro, D., Seyffert, N. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunologic*, (4): 1-15. doi: 10.4172/2155-9899.54-005.
- Chandra, S., Singh, T.R., Singh, D. (2010). Prediction and characterization of T-cell epitopes for epitope vaccine design from outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Bioinformatic*, 5(4): 151-166. doi: 10.6026/97320630005155.
- Christensen, H., Hickman, M., Edmunds, W.J., Trotter, C.L. (2013). Introducing vaccination against serogroup B meningococcal disease: An economic and mathematical modelling study of potential impact. *Vaccine*, 31(23): 2638-2646. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.034.
- Dalsass, M., Brozzi, A., Medini, D., Rappuoli, R. (2019). Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery. *Front Immunol*, (10): 113. doi: 10.3389/fimmu.2019.00113.
- Dhanda, S.K., Mahajan, S., Paul, S., Yan, Z., Kim, H., Jespersen, M.C., Jurtz, V., Andreatta, M., Greenbaum, J.A., Marcatili, P., Sette, A., Nielsen, M., Peters, B. (2019). IEDB-AR: immune epitope database-analysis resource in 2019. *Nucleic Acids Res*, 47(W1): W502-W506. doi: 10.1093/nar/gkz452.
- de Pinho, R.B., de Oliveira Silva, M.T., Bezerra, F.S.B., Borsuk, S. (2021). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(6): 2287-2296. doi: 10.1007/s00253-021-11191-4.
- Doytchinova, I.A. y Flower, D.R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, (8):4. doi: 10.1186/1471-2105-8-4.
- Doytchinova, I.A., Flower, D.R. (2008). Bioinformatic approach for identifying parasite and fungal candidate subunit vaccines. *Open Vaccine J.*, 1(1): 22-26. doi:10.2174/1875035400801010022.
- Droppa-Almeida, D., Franceschi, E., Ferreira, F.P. (2018). Immune-informatic analysis and design of peptide vaccine from multi-epitopes against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bioinfor Bio Insights*, 14(12): 1-9. <https://doi.org/10.1177/1177932218755337>.
- Fleri, W., Paul, S., Dhanda, S.K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B., y Sette, A. (2017). The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front Immunol*, 14(8): 278. doi: 10.3389/fimmu.2017.00278.
- Flower, D.R., Davies, M.N., Doytchinova, I.A. (2015). *Identification of candidate vaccine antigens in silico*, Springer. New York, USA, pp. 39-71.
- Franco, E.F, Rana, P., Queiroz Cavalcante, A.L., da Silva, A.L., Cybelle Pinto Gomide, A., Carneiro Folador, A.R., Azevedo, V., Ghosh, P. T. J., Ramos, R. (2020). Co-Expression Networks for Causal Gene Identification Based on RNA-Seq Data of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Genes* (Basel), 11(7): 794. doi: 10.3390/genes11070794.
- Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T. (2014). (2014). Vacceed: a high-throughput *in silico* vaccine candidate discovery pipeline for eukaryotic pathogens based on reverse vaccinology. *Bioinformatics*, 30(16): 2381-2383. doi: 10.1093/bioinformatics/btu300.
- He, Y., Xiang, Z., Mobley, H.L. (2010). Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J Biomed Biotechnol*, 297505. doi: 10.1155/2010/297505.
- Jespersen, M.C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*, 45(W1): W24-W29.
- Mahmood, Z.K.H., Jesse, F.F., Saharee, A.A., Jasni. S., Yusoff, R., Wahid, H. (2015). Clinico-pathological changes in goats challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (PLD). *Am J Anim Vet Sci.*, 10(3): 112-132. doi: <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2015.112.132>.
- Martini, S., Nielsen, M., Peters, B., Sette, A. (2020). The Immune Epitope Database and Analysis Resource Program 2003-2018: reflections and outlook. *Immunogenetics*, 72(1-2): 57-76. doi: 10.1007/s00251-019-01137-6.
- Michalik, M., Djahanshiri, B., Leo, J.C. y Linke, D. (2016). Reverse Vaccinology: The Pathway from Ge-

nomes and Epitope Predictions to Tailored Recombinant Vaccines. En: Sunil, T. (Ed.). Vaccine Design: Methods and Protocols: Volume 1. USA.

Odhah, M.N., Jesse, F.F.A., Teik, C.E.L., Mahmood, Z., Wahid, H.A., Mohd, L.M.A. (2019). Clinico-pathological responses and PCR detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. *Microb Pathog*, (135): 103628. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103628.

Ong, E., Wang, H., Wong, M.U., Seetharaman, M., Valdez, N., He, Y. (2020). Vaxign-ML: supervised machine learning reverse vaccinology model for improved prediction of bacterial protective antigens. *Bioinformatics*, 36(10): 3185-3191. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa119.

Pereira, R., Oliveira, J., Sousa, M. (2020). Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J Clin Med*, 9(1):132. doi: 10.3390/jcm9010132.

Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P.E., Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes New Infect*, (7): 72-85. doi: 10.1016/j.nmni.2015.06.005.

Santana-Jorge, K.T., Santos, T.M., Tartaglia, N.R., Aguiar, E.L., Souza, R.F., Mariutti, R.B., Eberle, R.J., Arni, R.K., Portela, R.W., Meyer, R., Azevedo, V. (2016). Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. *Microb Cell Fact*, (15): 83. doi: 10.1186/s12934-016-0479-6.

Santos, A.R., Carneiro, A., Gala-García, A., Pinto, A., Barh, D., Barbosa, E., Aburjaile, F., Dorella, F., Rocha, F., Guimarães, L., Zurita-Turk, M., Ramos, R., Almeida, S., Soares, S., Pereira, U., Abreu, V.C., Silva, A., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2012). The *Corynebacterium pseudotuberculosis in silico* predicted pan-exoproteome. *BMC Genomics*, 13 Suppl 5(Suppl 5): S6. doi: 10.1186/1471-2164-13-S5-S6.

Soares, S.C., Trost, E., Ramos, R.T., Carneiro, A.R., Santos, A.R., Pinto, A.C., Barbosa, E., Aburjaile, F., Ali, A., Diniz, C.A., Hassan, S.S., Fiaux, K., Guimarães, L.C., Bakhtiar, S.M., Pereira, U., Almeida, S.S., Abreu, V.A., Rocha, F.S., Dorella, F.A., Miyoshi, A., Silva, A., Azevedo, V., Tauch, A. (2013a). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. *J Biotechnol*, 167(2): 135-141. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.11.003.

Soares, S.C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., Carneiro, A., Ali, A., Santos, A.R., Pinto, A.C., Diniz, C., Barbosa, E.G., Dorella, F.A., Aburjaile, F., Rocha, F.S., Nascimento KK, Guimarães LC, Almeida S, Hassan SS, Bakhtiar SM, Pereira UP, Abreu V.A., Schneider, M.P., Miyoshi, A., Tauch, A., Azevedo, V. (2013b). The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar *ovis* and *equi* strains. *PLoS One*, 8(1):e53818. doi: 10.1371/journal.pone.0053818.

Soria-Guerra, R.E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D.O., Rosales-Mendoza, S. (2015). An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *J Biomed Inform*, (53): 405-414. doi: 10.1016/j.jbi.2014.11.003.

Zaharieva, N., Dimitrov, I., Flower, D.R., Doytchinova, I. (2017). Immunogenicity prediction by VaxiJen: A ten year overview. *J Proteomics Bioinform*, (10):298-310. doi:10.4172/JPB.1000454.

# ENTENDIENDO LA COGNICIÓN CANINA | UNDERSTANDING CANINE COGNITION

Aislinn Yamileth Magadan Rojas,<sup>1,\*</sup> Jennifer Romero Reyes,<sup>2</sup> Sergio Sanabria Cera<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

\* Autor de correspondencia: yamagadan24@gmail.com

## RESUMEN

La cognición es la facultad de un ser vivo para procesar información a partir de la percepción, el conocimiento adquirido y las características ambientales; en perros se implican procesos mentales de atención, memoria, y comprensión de señales (visuales, olfativas y de contacto) para crear nuevo conocimiento y utilizar dichos procesos para la solución de problemas. En diversos trabajos se ha expuesto que el ser humano ha seleccionado las características innatas de los perros para obtener sujetos que se ajusten a sus preferencias y necesidades, en este artículo tendremos un acercamiento desde la cognición hasta el adiestramiento.

**Palabras clave:** Cognición, perro, comportamiento, adiestramiento.

## Abstract

Cognition is the faculty of a living being to process information from perception, acquired knowledge and environmental characteristics; in dogs mental processes of attention, memory, and comprehension of signals (visual, olfactory and contact) are involved to create new knowledge and use these processes for problem solving. In several works it has been exposed that the human being has selected the innate characteristics of dogs to obtain subjects that adjust to their preferences and needs, in this article we will have an approach from cognition to training.

**Key words:** Cognition, dog, behavior, training.

## INTRODUCCIÓN

Muchos investigadores que estudian la cognición animal coinciden en que los animales “piensan”, es decir, perciben y reaccionan a su entorno, interactúan entre sí y experimentan diferentes emociones, como la ansiedad o el miedo. Sin embargo, ha sido ampliamente debatido tanto en los campos de la etología (el estudio del comportamiento animal) como en la psicología, si son “conscientes” de la misma manera que los humanos (García, 2004).

Las ciencias cognitivas empiezan a desarrollarse a partir de los años 50, investigadores de las áreas de filosofía, psicología, neurociencia, inteligencia artificial y lingüística desarrollaron teorías sobre el funcionamiento del cerebro basadas en el procesamiento de la información que va más allá de la mera introspección o de la observación de estímulos y respuestas (Dehaene, 2019).

Edward L. Thorndike fue pionero en la metodología experimental aplicada al estudio de la cognición animal y abogó, que más allá de la observación de las capacidades para ejecutar tareas, presentan capacidades cognitivas sensoriales que aplican en la resolución de problemas espaciales, físicos y sociales; fenómenos que se integran a través de la memoria, aprendizaje, socialización, refuerzo y castigo (Thorndike, 2017).

### Historia y teorías

Todo inicia con los trabajos de Darwin en 1837 con su escrito titulado *Aún la mente y el instinto*, donde debatía la razón (argumento para probar algo o persuadir), cuyos aportes permitieron el desarrollo de teorías explicativas sobre el comportamiento animal en diferentes áreas del conocimiento (Belger et al., 2018).

Darwin argumentó “la psicología encontraría una base segura [...] en el fundamento [...] de la adquisición necesaria de cada poder mental y de cada capacidad mental en forma gradual” (es decir, a través de la selección natural) (Darwin, 1963).

En 2017 Parker y Gilbert atribuyeron que la domesticación fue un factor importante en la historia de la humanidad, ya que desde hace más de 3000 años ejercen tareas que son de beneficio mutuo (caza, vigilancia y seguridad), ayudando a los asentamientos (H. G. Parker et al., 2015; H. G. a. G. Parker, S. F., 2017). Desde una perspectiva comparada, los perros se han convertido en un caso interesante, dado el creciente acuerdo científico de que su domesticación puede considerarse como un proceso evolutivo (Price, 1984), durante el cual las capacidades de los lobos se transformaron específicamente por los desafíos de convivir con los humanos (Miklósi et al., 2013).

Otro de los estudios populares es del investigador ruso Ivan Pavlov, quien se dio a conocer por sus experimentos en perros, siendo considerado como el primer conductista, elaborando un modelo al que llamó “condicionamiento clásico o respondiente”, que se caracteriza por lograr que un organismo genere una respuesta fisiológica e involuntaria a partir de un estímulo que originalmente no lo provocaba (Reyna, 2017). Mientras que la etología cognitiva postula cómo los animales disponen de mecanismos neurobiológicos, cognitivos y comportamentales para percibir e interpretar los estímulos (caricias, tono de voz, olores y sonidos) del ambiente y tomar decisiones con base en ello (Miklósi & Topál, 2013).

### Evolución y ontogenia

Trabajos comparativos de la cognición canina como los de Miklósi describen el término “competencia social evolutiva” como una cualidad de los individuos que interactúan y que se manifiesta como un sistema de habilidades comportamentales pro sociales (eliminar los factores que los obstaculizan) y coercitivo (control de comportamiento) expresadas por individuos de una especie, asimismo proporciona un concepto útil para investigaciones comparativas sobre los efectos evolutivos y del desarrollo de las habilidades socio-cognitivas caninas (Miklósi & Topál, 2013).

Sin embargo, la naturaleza inusual de la comprensión de nuestros gestos por parte de los perros generó interés por comprender los orígenes de estas habilidades desde una perspectiva ontogenética y filogenética. Evidencia descrita en los artículos de (Palmer et al., 2008; J. Topál et al., 1998), indica que la relación entre un perro y su dueño cumple criterios conductuales de apego [p. ej., acercarse al cuidador en momentos de angustia emocional, utilizar al cuidador como base segura para exploración (Ainsworth, 1969; Rajecki et al., 1978)]. Lo anterior, también es respaldado por investigaciones que muestran rasgos característicos de apego hacia los cuidadores en los perros, mientras que los lobos carecen de un mecanismo similar de organización de comportamiento (József Topál et al., 2005). Un ejemplo de estos comportamientos se puede observar en los experimentos realizados en 1959 por la bióloga rusa Lyudmila Trut con zorros plateados, quien cambió el comportamiento y la adaptabilidad de dichos animales a los humanos (Trut et al., 2009).

Científicos como Hare y Tomasello (2005) sugirieron que la domesticación afectó la respuesta de agresión/miedo de los animales, esto permitió que sus habilidades cognitivas sociales naturales se desarrollaran gracias a la selección direccional (cambio evolutivo que suele verse en entornos que han sido modificados con el tiempo) (B. Hare et al., 2005).

Topál y colaboradores en 2009 utilizaron un enfoque teórico de sistemas y propuso que la domesticación es menos probable que la cognición social en los perros, y que esto ocurrió como resultado de un cambio fundamental en un solo aspecto del sistema de comportamiento social-afiliativo. Afirmaron que las habilidades sociales caninas se perfeccionaban mediante pequeños cambios genéticos que afectan a diferentes componentes de sociabilidad (p ej. apego, cooperación, mayor socialización, atención). Otros han enfatizado el papel de la influencia ambiental y han favorecido la posición de que gran parte de la variación entre perros y lobos depende de su ontogenia (József Topál et al., 2009).

Cada teoría científica sobre la evolución de la cognición social canina puede tener sus méritos, tanto las deficiencias metodológicas en la investigación experimental como la falta de un marco funcional para la cognición social han impedido la reconciliación de algunas hipótesis.

### Genética cognitiva

Aunque existe gran dificultad para establecer un momento exacto desde el comienzo de la domesticación, Freedman y colaboradores (2014) indican que la domesticación inicial del perro suscitó hace 11.000 - 16.000 años; anterior al auge de la agricultura (Freedman et al., 2014). Hoy en día, gracias a las avanzadas técnicas genómicas se ha obtenido más información acerca del origen y de los cambios genéticos que crearon al perro, algunos de esos cambios incluyen enfermedades que se asemejan a algunas halladas en el ser humano (p ej. parvovirus), con lo cual se utilizan en muchos estudios comparativos (H. G. a. G. Parker, S. F., 2017).

Los estudios moleculares han intentado fechar la divergencia, resultado del aislamiento por barreras o distancia geográfica donde el intercambio de material genético es limitado; entre el perro y el lobo utilizando múltiples conjuntos de datos y metodologías. Analizando el ADN mitocondrial, se ha cronometrado la divergencia perro-lobo entre 5.400 y >100.000 años (Boivin, 2020), siendo filogenéticamente más viejo el lobo. Existe una gran dificultad para establecer un momento exacto de domesticación debido a múltiples fuentes de conflicto, y aún se desconoce la tasa de mutación del genoma del perro; debido a que los tiempos de divergencia se estiman en función de las tasas de mutación supuesta que consideran que existe un cambio en la secuencia de ADN de un organismo, pero no ha sido verificada. Es decir, la tasa de mutación en perros se considera en  $1,4 \times 10^{-8}$  frente a la tasa de mutación en lobos que es de  $2,2 \times 10^{-9}$  (Vonholdt et al., 2016). La interpretación de las señales filogenéticas en estos genomas es particularmente desafiante debido a los altos niveles de

clasificación de linaje incompleta y flujo de genes posterior a la divergencia (Thalmann et al., 2013). Sin embargo, el genoma del perro doméstico, como compañero cercano de los humanos, ha sido alterado constantemente mediante intensas presiones selectivas para obtener rasgos especializados (Akey et al., 2010; Sutter et al., 2004).

Miho Nagasawa (2023) indicó que “se cree que las habilidades cognitivas sociales de los perros se adquirieron como un subproducto de las mutaciones de la respuesta al estrés”. Los perros tienen respuesta reducida al estrés debido a mutaciones en el sistema nervioso central a nivel dopaminérgico, serotoninérgico y de oxitocina (di Rocco, 2010); por ello, desarrollan temperamento tolerante con quienes deberían competir, los humanos, y han adquirido habilidades cognitivas sociales similares a los mismos (Brian Hare et al., 2013). Basándose en la hipótesis de los trabajos de Hare & Woods, 2013; Nagasawa indicó que los perros, al igual que los bebés humanos, utilizan la mirada como comportamiento de apego para promover la secreción de oxitocina (OT) en sus dueños (Nagasawa et al., 2015), sugieren que al utilizar habilidades cognitivas sociales similares a las de los humanos, los perros pueden formar vínculos emocionales y ganar una posición en la sociedad humana (Nagasawa, 2023).

Otros enfoques se emplazan en la cognición no centrada en el sistema nervioso central; como la cognición distribuida, que hace referencia a los recursos que se comparten entre los múltiples agentes que requiere una tarea (Hutchins, 1995), fijando unidades de análisis en las dinámicas sociales y ambientales distribuidas que se rigen mediante restricciones materiales, organizativas y situacionales que recaen en variados agentes como las características del entorno y sus interacciones (Ortega-Pérez, 2019).

### Cognición y comportamiento

El comportamiento animal es el resultado de la biología y el medio ambiente; los cambios de comportamiento se desencadenan por una señal interna o externa, por ejemplo, la aparición de una amenaza cercana, dando respuestas de conductas que son inducidas por impulsos primarios de supervivencia y reproducción. Si bien, el comportamiento animal puede variar ampliamente según el individuo, ciertos rasgos de comportamiento, como la búsqueda de atención y la persecución de presas se heredan genéticamente (Trigoso, 2007). Mientras que la cognición canina hace referencia a las distintas maneras en que los perros adquieren información del entorno por medio de los sentidos (olfato, audición, tacto, vista, gusto), la retienen, la procesan y toman una decisión de comportamiento (Shettleworth, 2001).

Los autores contemporáneos como es el caso de Clive Wynne y Brian Hare tienen puntos de vista distintos. Brian Hare, antropólogo evolutivo e investigador del comportamiento canino de la Universidad Duke, Durham, USA y fundador del Centro de Cognición Canina Duke, publicó en 2013 “The Genius of Dogs”, donde resalta la importancia de estudiar a los perros tal como son, centrándose en sus rasgos de comportamiento específico y el impacto de las interacciones humanas. Definiendo como cognición canina al “genio canino”, producto de un proceso de auto domesticación al que los perros se sometieron a lo largo de la historia de su génesis y evolución, su teoría recoge la idea de que los perros poseen habilidades cognitivas únicas que los distinguen de otras especies: una inteligencia social sin precedentes que vinculó su asociación a nuestra especie (Brian Hare & Woods, 2013).

Mientras que Clive Wynne enfatiza las cualidades y características únicas de los perros como especie, aquellas que los diferencian del resto de animales atendiendo particularmente a la relación de estos con los seres humanos, argumentando que los perros han evolucionado para desarrollar ciertas habilidades sociales, como la capacidad de comprender señales sociales humanas o la de formar fuertes lazos afectivos y emocionales interespecie con humanos (Wynne, 2019).

## Cognición y Adiestramiento

Cuando se comienza el adiestramiento de un perro, lo primero que se debe tener en claro es evitar el proceso de humanización del animal, y tener presente que el perro es perro y no tiene las mismas capacidades intelectuales del hombre; piensan diferente y hay que tratarlos de acuerdo a la etología de su especie (de Martín, 2018). El perro aprende fundamentalmente por dos vías: una por la que nosotros le enseñamos a realizar alguna actividad, independientemente de si hay un proceso de entendimiento o no; y una segunda vía que es la experiencia del individuo. No obstante, existen una serie de factores que debemos conocer y que influyen no solo en la cognición, sino en el comportamiento del propio perro y que nos facilitará el adiestramiento (Aldaz Bustillo et al., 2012).

De acuerdo con estudios en relación a inteligencia animal desarrollados por Watson en 1911 y Thorndike, 2017; los factores que influyen a la hora del adiestramiento son (Thorndike, 2017; Watson, 1911):

- Socialización: en este periodo, es necesario someter al cachorro de forma controlada a todos los estímulos posibles, dando como resultado un perro adulto equilibrado y sin miedos.
- Aprendizaje: es el cambio o modificación de la conducta como consecuencia de la experiencia y que no puede explicarse en términos de fa-

tiga muscular, de adaptación de los receptores sensoriales o maduración del sistema nervioso.

- Refuerzo: son todos aquellos estímulos que favorecen que una respuesta o conducta se repita ya sea positivamente [p. ej. el dispensador de alimento o caricias (Yin et al., 2008)] o negativamente (p. ej. el collar o bozal de castigo) esto es de acuerdo a las actividades que se les pide siempre buscando el bienestar animal.
- Castigo: es la aplicación de un estímulo aversivo o la eliminación de un estímulo positivo para evitar que se dé una conducta. El simple hecho de privarlos de libertad y llevarlos de nuevo a la perrera cuando hacen algo mal.
- Memoria: es la facultad de recordar algo vivido o aprendido. El esquema es sencillo, el perro tiene instintos sobre los que actúan los estímulos que activan los impulsos generando un comportamiento. Este comportamiento puede ser modificado con el aprendizaje para obtener perros adiestrados.

Gracias a estos factores, se han empleado dos tipos de adiestramiento:

- a. Cognitivo-emocional: Los perros en varios roles de trabajo se someten a una cuidadosa selección y formación rigurosa, pero hoy en día las organizaciones todavía enfrentan altas tasas de fracaso debido a problemas de comportamiento (Foraita et al., 2024). Sin embargo, *Assistance Dogs International* define tres tipos de perros en asistencia cognitivo-emocional, 1) los perros guía ayudan a las personas con deficiencias visuales, 2) perros auditivos que ayudan a personas con discapacidad auditiva y 3) perros que ayuden a personas con discapacidades que no sean ceguera o sordera. Más concretamente, según lo definido por (Rodríguez et al., 2020), los perros de servicio son aquellos que ayudan a las personas con discapacidades físicas (p. ej., realizando tareas relacionadas con la movilidad, como tirar de una silla de ruedas o recuperar artículos caídos), individuos con afecciones médicas [p. ej., alertar o responder a crisis médicas tales hipoglucemias o convulsiones (Wells et al., 2016) y a las personas con trastornos de salud mental (p. ej., perros de servicio psiquiátrico para trastorno de estrés post-traumático o trastorno del espectro autista).
- b. Socio-cognitivo, consiste en entrenar al perro para conseguir que emita ciertas conductas mediante la comprensión de la situación (social o de peligro), no a través de una respuesta condicionada (Ivry et al., 2014).

Estos principales tipos de adiestramiento también se apoyan con ciertas técnicas como es el caso de

adiestramiento con refuerzo positivo (estímulo agradable cuando el perro realiza una conducta adecuada) como el *clicker training*, que consiste en utilizar un pequeño dispositivo que emite un sonido metálico tipo “clic” al presionarlo. Este es un método de entrenamiento de refuerzo positivo, donde un entrenador combina un refuerzo primario, como la comida, con un clic audible producido a partir de un dispositivo mantenido en la mano del entrenador (Dorey et al., 2020). Los defensores del entrenamiento de clicker han informado que el uso de esta técnica en entornos aplicados ayuda a los perros a aprender más rápido, los hace más ansiosos por aprender y fomenta la resolución de problemas (Feng et al., 2018).

Las técnicas con castigo, como el collar o bozal y la estimulación eléctrica, pueden ser efectivas en la corrección de comportamientos no deseados (aullidos, ansiedad, agresividad o destrozos), pero también pueden causar dolor y estrés al perro y dañar la relación perro-dueño y finalmente la técnica de espejo consiste en

utilizar a otro perro para demostrar una orden o un tipo de comportamiento (Miranda, 2010; Pilley et al., 2011).

## CONCLUSIONES

La cognición juega un papel importante en el aprendizaje. Los perros tienen la capacidad de reconocer a personas y a otros animales; son capaces de utilizar gestos de comunicación humana, es decir, señales auditivas y visuales combinadas con señales referenciales; permitiendo una interacción fuerte entre ambas especies lo que fomentó la domesticación.

Tener un perro adiestrado es gratificante tanto para el dueño como para el can. Se evitan problemas de conducta, de ansiedad por separación y de agresión competitiva hacia otros perros. El adiestramiento es una cuestión de bienestar animal, lo que puede disminuir el número de perros abandonados. Su éxito requiere la composición de 3 factores principales: los perros, sus dueños y la conexión entre ambos (Stevens et al., 2021).

## REFERENCIAS

- Ainsworth, M. D. S. (1969). Object relations, dependency, and attachment: A theoretical review of the infant-mother relationship. *Child development*, 40(4): 969-1025.
- Akey, J. M., Ruhe, A. L., Akey, D. T., Wong, A. K., Connelly, C. F., Madeoy, J., .Neff, M. W. (2010). Tracking footprints of artificial selection in the dog genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(3): 1160-1165. doi:10.1073/pnas.0909918107.
- Aldaz Bustillo, M. I. & Garzon Quintana, J. A. (2012). *Centro de adiestramiento canino” MILCAC” SA.*
- Belger, J. & Bräuer, J. (2018). Metacognition in dogs: Do dogs know they could be wrong? *Learning & behavior*, 46(4): 398-413.
- Boivin, C. (2020). *Del lobo al perro: historia de su origen y evolución de las razas.* Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.
- Darwin, C. (1963). *El origen de las especies por la selección natural:* Ediciones Ibéricas y LCL. de Martín, M. I. (2018). Adiestramiento canino en las Fuerzas Armadas. *Armas y Cuerpos*(138): 53-60.
- Dehaene, S. (2019). ¿Cómo aprendemos?: Los cuatro pilares con los que la educación puede potenciar los talentos de nuestro cerebro: Siglo XXI Editores.
- di Rocco, C. (2010). B.J. Baars and N.M. Gage (eds.). Cognition, brain and consciousness. *Child’s nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 26. doi:10.1007/s00381-010-1178-y
- Dorey, N. R., Blandina, A., & Udell, M. A. (2020). Clicker training does not enhance learning in mixed-breed shelter puppies (*Canis familiaris*). *Journal of Veterinary Behavior*, (39), 57-63.
- Feng, L. C., Howell, T. J. & Bennett, P. C. (2018). Practices and perceptions of clicker use in dog training: A survey-based investigation of dog owners and industry professionals. *Journal of Veterinary Behavior*, (23), 1-9.
- Foraita, M., Howell, T. & Bennett, P. (2024). Executive functions in a population of guide dog candidates. *Applied animal behaviour science*, (270): 106126.
- Freedman, A. H., Gronau, I., Schweizer, R. M., Ortega-Del Vecchyo, D., Han, E., Silva, P. M., Novembre, J. (2014). Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genet*, 10(1), e1004016. doi:10.1371/journal.pgen.1004016.
- García, C. A. L. (2004). *Adiestramiento canino cognitivo-emocional:* Ediciones Díaz de Santos.

Hare, B., & Tomasello, M. (2005). Human-like social skills in dogs? *Trends Cogn Sci*, 9(9), 439-444. doi:10.1016/j.tics.2005.07.003.

Hare, B. & Woods, V. (2013). *The genius of dogs: discovering the unique intelligence of man's best friend*: Simon and Schuster.

Hutchins, E. (1995). *Cognition in the Wild*: The MIT Press.

Ivry, R. B., & Mangun, G. R. (2014). Cognitive Neuroscience: The biology of the mind. *Cuadernos de Neuropsicología/Panamerican Journal of Neuropsychology*, (4)1:87-90.

Miklósi, Á. & Topál, J. (2013). What does it take to become 'best friends'? Evolutionary changes in canine social competence. *Trends in cognitive sciences*, 17(6): 287-294.

Miranda, A. P. (2010). *Psicología y aprendizaje del adiestramiento del perro*: Ediciones Díaz de Santos.

Nagasawa, M. (2023). Development of Stress Responsiveness and Maternal Behavior in Dogs. *Japanese Journal of Animal Psychology*, 73(2): 139-153. doi:10.2502/janip.73.2.11.

Nagasawa, M., Mitsui, S., En, S., Ohtani, N., Ohta, M., Sakuma, Y., Kikusui, T. (2015). Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds. *Science*, 348(6232): 333-336.

Ortega-Pérez, C.-J. (2019). *Cognición social canina*. Universidad Internacional de Andalucía.

Palmer, R. & Custance, D. (2008). A counterbalanced version of Ainsworth's Strange Situation Procedure reveals secure-base effects in dog-human relationships. *Applied animal behaviour science*, 109(2-4): 306-319.

Parker, H. G. & Gilbert, S. F. (2015). From caveman companion to medical innovator: genomic insights into the origin and evolution of domestic dogs. *Adv Genomics Genet*, (5): 239-255. doi:10.2147/agg.S57678

Parker, H. G. a. G., S. F. (2017). 'Insights Into the Origin and Evolution of Domestic Dogs', pp. 239-255.

Pilley, J. W., & Reid, A. K. (2011). Border collie comprehends object names as verbal referents. *Behavioural processes*, 86(2): 184-195.

Price, E. O. (1984). Behavioral aspects of animal domestication. *The quarterly review of biology*, 59(1): 1-32.

Rajecki, D. W., Lamb, M. E. & Obmascher, P. (1978). Toward a general theory of infantile attachment: A comparative review of aspects of the social bond. *Behavioral and Brain Sciences*, 1(3): 417-436.

Reyna, S. M. (2017). *Psicología como Ciencia y sus Procesos Básicos*. Retrieved from uaemex: [http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/79644/secme9274\\_1.pdf?sequence=1](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/79644/secme9274_1.pdf?sequence=1), [consultado 26 de abril 2024].

Rodriguez, K. E., Greer, J., Yalcilla, J. K., Beck, A. M. & O'Haire, M. E. (2020). The effects of assistance dogs on psychosocial health and wellbeing: A systematic literature review. *PLoS One*, 15(12): e0243302.

Shettleworth, S. J. (2001). Animal cognition and animal behaviour. *Animal behaviour*, 61(2): 277-286.

Stevens, J. R., Wolff, L. M., Bosworth, M., & Morstad, J. (2021). Dog and owner characteristics predict training success. *Animal Cognition*, 24(2): 219-230.

Sutter, N. B., Eberle, M. A., Parker, H. G., Pullar, B. J., Kirkness, E. F., Kruglyak, L., & Ostrander, E. A. (2004). Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. *Genome Res*, 14(12): 2388-2396. doi:10.1101/gr.3147604.

Thalmann, O., Shapiro, B., Cui, P., Schuenemann, V. J., Sawyer, S. K., Greenfield, D. L., Wayne, R. K. (2013). Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science*, 342(6160): 871-874. doi:10.1126/science.1243650.

Thorndike, E. (2017). *Animal intelligence: Experimental studies*: Routledge.

Topál, J., Gácsi, M., Miklósi, Á., Virányi, Z., Kubinyi, E. & Csányi, V. (2005). Attachment to humans: a comparative study on hand-reared wolves and differently socialized dog puppies. *Animal behaviour*, 70(6): 1367-1375.

Topál, J., Miklósi, A., Csányi, V. & Dóka, A. (1998). Attachment behavior in dogs (*Canis familiaris*): a new application of Ainsworth's (1969) Strange Situation Test. *J Comp Psychol*, 112(3): 219-229. doi:10.1037/0735-7036.112.3.219.

Topál, J., Miklósi, Á., Gácsi, M., Dóka, A., Pongrácz, P., Kubinyi, E., Csányi, V. (2009). Chapter 3 The Dog as a Model for Understanding Human Social Behavior. In *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 39, pp. 71-116): Academic Press.

Trigoso, R. (2007). *Manual de Adiestramiento canino: Obediencia básica*. Retrieved from <https://www.expertoanimal.com/media/manualdeadiestramientocanino.pdf>, [consultado 26 de abril 2024].

Trut, L., Oskina, I. & Kharlamova, A. (2009). Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *Bioessays*, 31(3): 349-360. doi:10.1002/bies.200800070.

Vonholdt, B. & Driscoll, C. (2016). Origins of the dog: Genetic insights into dog domestication. In (pp. 22-41).

Watson, J. (1911). Animal Intelligence. In: JSTOR.

Wells, D. L., Hepper, P. G., Milligan, A. D. & Barnard, S. (2016). Comparing lateral bias in dogs and humans using the Kong™ ball test. *Applied animal behaviour science*, (176): 70-76.

Wynne, C. D. (2019). *Dog is love: Why and how your dog loves you*: Houghton Mifflin.

Yin, S., Fernandez, E. J., Pagan, S., Richardson, S. L. & Snyder, G. (2008). Efficacy of a remote-controlled, positive-reinforcement, dog-training system for modifying problem behaviors exhibited when people arrive at the door. *Applied animal behaviour science*, 113(1-3): 123-138.

# VACUNAS DE ADN, UNA ALTERNATIVA EN LA MEDICINA VETERINARIA

# DNA VACCINES, AN ALTERNATIVE APPROACH IN VETE- RINARY MEDICINE

Galván-Arellano D.M.,<sup>1</sup> Lagunes-Quintanilla R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, México.

## RESUMEN

Las vacunas génicas utilizan fragmentos de ADN para estimular una respuesta inmunitaria contra virus o bacterias. Se integran genes de interés en células mediante plásmidos, provocando la producción de proteínas extrañas que desencadenan respuestas celulares y por consiguiente la generación de anticuerpos. Estas vacunas presentan una serie de ventajas significativas respecto a las convencionales. Entre ellas se destaca su producción, la cual es relativamente sencilla y económica. Además, no necesitan ser almacenadas ni transportadas en cadena fría, lo que simplifica su logística y reduce los costos asociados con su distribución y conservación. A la fecha, en Medicina Veterinaria solo cinco vacunas han sido aprobadas, lo cual resalta la importancia de seguir realizando investigaciones con la finalidad de evaluar posibles candidatos a vacunas que contribuyan a la prevención de enfermedades emergentes y reemergentes en animales. El objetivo de esta revisión es abordar de forma general el funcionamiento y las aplicaciones de las vacunas de ADN en el ámbito veterinario.

**Palabras clave:** Vacuna, ADN, Medicina Veterinaria, Plásmido.

## Abstract

Gene vaccines use DNA fragments to stimulate an immune response against viruses or bacteria. Genes of interest are integrated into cells using plasmids, causing the production of foreign proteins that trigger cellular responses and, consequently, the generation of antibodies. These vaccines have several significant advantages over conventional vaccines. Among them is their production, which is relatively simple and inexpensive. In addition, AND vaccines do not need to be stored or transported in the cold chain, simplifying logistics and reducing the costs associated with their distribution and conservation. To date, only five vaccines have been approved in veterinary medicine, enhancing the importance the importance of continuing research to evaluate potential new vaccine candidates for preventing and curing emerging and re-emerging diseases in animals. The aim of this review is to address the performance and applications of DNA vaccines in the veterinary field in general. .

**Key words:** Vaccine, DNA, Veterinary Medicine, Plasmid.

## INTRODUCCIÓN

La vacunación representa uno de los logros más significativos en la historia de la medicina. Gracias a la implementación de programas regulares de inmunización, se ha conseguido controlar con éxito numerosas enfermedades, e incluso erradicar algunas como la viruela a nivel global (Bermejo, 2012).

En la década de 1990, se evidenció la capacidad de transfectar células *in vivo* con ácido desoxirribonucleico (ADN) desnudo, permitiendo la expresión de antígenos capaces de inducir tanto respuestas inmunitarias humorales como celulares. No obstante, fue en 1992 cuando se publicó la primera descripción de que la vacunación con ADN podía provocar respuestas inmunitarias. Este hallazgo marcó el surgimiento de las vacunas de tercera generación, también conocidas como vacunas génicas (Wolff et al., 1999; Tang, DeVit & Johnston, 1992).

Las vacunas de ADN expresan antígenos en células huésped transfectadas, generando antígenos “endógenos”. Estos antígenos son altamente eficaces para desencadenar respuestas de células T debido a su fácil acceso a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II. Como resultado, se generan respuestas de células T CD4+ y CD8+. Una respuesta inmunitaria robusta de las células T colaboradoras es esencial para inducir el desarrollo de células B de alta calidad y la producción de anticuerpos (Wang & Lu, 2013).

Así, las vacunas génicas combinan muchas de las características deseables de las vacunas tradicionales, pero ofrecen ventajas adicionales, tales como seguridad, capacidad para inducir una respuesta inmunitaria celular y humoral, facilidad para modificar los antígenos codificados en los plásmidos, menor costo en la producción a gran escala y una vida media más larga. Esto proporciona una mejor estabilidad en cuanto a la temperatura de almacenamiento y transporte, permitiendo prescindir de la cadena fría utilizada en las vacunas convencionales (Shedlock & Weiner, 2000).

## ESTRUCTURA DE UNA VACUNA DE ADN

La conformación de una vacuna de ADN se puede dividir en dos elementos principales: el vector de ADN de la vacuna y el inserto del gen diana (figura 1) (Lu, Manning & Arthos, 2003).

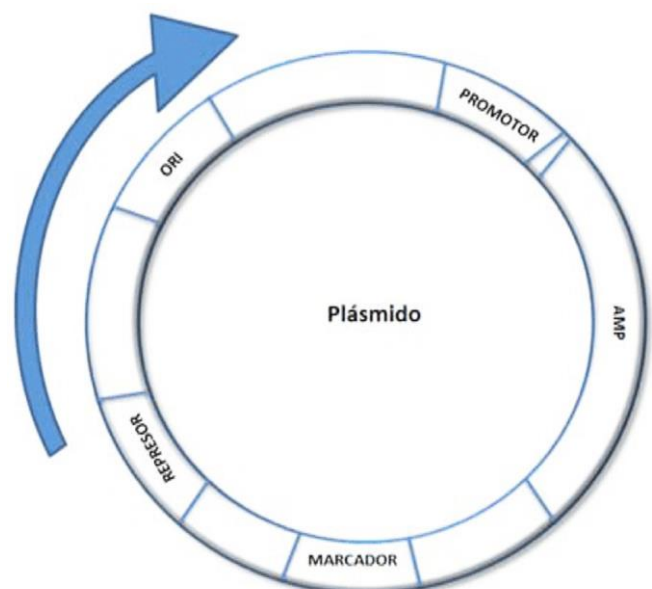
El **vector de vacuna de ADN** está compuesto por la estructura principal de un plásmido de expresión en mamíferos y la unidad transcripcional. Los plásmidos bacterianos son moléculas de ADN circular que se autorreplican de forma extracromosómica en las bacterias (Babiuk et al., 2000; Kowalczyk & Ertl, 1999). La composición del plásmido incluye un replicón de ADN, que es un

origen de replicación (*ori*), para permitir la amplificación del plásmido en bacterias, así como un gen de resistencia a antibióticos (ampicilina o kanamicina) que facilita el crecimiento selectivo de las bacterias que portan el plásmido (Srivastava & Liu, 2003; Huygen, 2005).

La **unidad transcripcional** contiene un promotor, generalmente de origen viral, como el del citomegalovirus humano (CMV), el virus del sarcoma de Rous (RSV) o el virus de simios 40 (SV-40). Estos promotores son secuencias cortas de ADN a las que se unen diversos factores de transcripción que ayudan a guiar y activar a las polimerasas y se encuentran activos de forma constitutiva en la mayor parte de las células eucariotas (Reyes-Sandoval & Ertl, 2001; Babiuk et al., 2000). Muchas vacunas utilizan la secuencia terminadora de la hormona del crecimiento bovino, ubicada aguas abajo del marco de lectura abierto (ORF del inglés *open reading frame*) del gen de interés, para asegurar una finalización transcripcional adecuada (Montgomery et al., 1993).

El **inserto del gen diana**, consiste en la secuencia que codifica para la proteína o fragmento específico del patógeno de interés, destinado a ser reconocido por el sistema inmunológico. Una de las formas más efectivas de aumentar la producción de proteínas es mediante la optimización de codones (Gustafsson et al., 2004). Por ejemplo, muchos aminoácidos pueden ser codificados por más de un codón, y diferentes organismos muestran preferencia por ciertos codones (Montgomery et al., 1993). Se ha descubierto que al cambiar los codones preferidos por un virus o bacteria por aquellos preferidos por las células de mamíferos da como resultado una mayor producción de proteínas, lo que conduce a respuestas mejoradas de células T (Ramakrishna et al., 2004; Frelin et

Figura 1. Esquema de un plásmido con resistencia a un antibiótico (ampicilina)



Fuente: Tomado de Loera-Valenzuela et al., 2016.

al., 2004) y producción de anticuerpos protectores (Cheung et al., 2004; Kutzler & Weiner, 2008).

## Producción de vacunas de ADN

Una vez construido el plásmido de la vacuna, este se inserta en huéspedes bacterianos donde el crecimiento bacteriano produce múltiples copias del plásmido. Comúnmente se emplean cepas de *Escherichia coli*, como *HB101* y *DH5* (Wang & Lu, 2013). La transformación de ADN plasmídico en *E. coli* mediante el método de choque térmico es una técnica que consiste en insertar un plásmido extraño o un producto de ligación en las bacterias. Después de una breve incubación en hielo, se coloca una mezcla de bacterias químicamente competentes y ADN a 42 °C durante 45 segundos (choque térmico) y luego se vuelve a colocar en hielo. Se añade medio y las células transformadas se incuban a 37 °C durante 30 min con agitación (Froger & Hall, 2007). Las células bacterianas se cultivan en medio de lisogenia (LB) que contiene los antibióticos deseados (p.ej. ampicilina) para llevar a cabo la selección de las células que han adquirido el plásmido (Yadav et al., 2014). El ADN plasmídico es luego purificado de las bacterias separando el plásmido circular

del ADN bacteriano mucho más vacua. Se pueden lograr diferentes escalas de purificación de plásmidos utilizando kits de purificación de ADN disponibles comercialmente. Por ejemplo, el kit giga-prep de Qiagen es útil para la producción de hasta 10 mg de plásmidos de ADN (Wang & Lu, 2013; Yadav et al., 2014).

## Vías de administración

Las vacunas de ADN ofrecen una flexibilidad única al poder administrarse a través de diversas vías, y la elección de esta ruta puede influir significativamente en la eficacia y la respuesta inmune generada. Se estima que solo entre el 1 y 10% del ADN total inoculado se procesa de manera eficiente para expresar la proteína de interés (Reyes-Sandoval & Ertl, 2001; Kowalczyk & Ertl, 1999).

Entre las vías de administración conocidas para las vacunas de ADN se encuentran la intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal, epidérmica mediante escarificación de la piel, oral, intranasal y vaginal (López et al., 2013). La elección de la vía de administración dependerá de varios factores, como la especie animal, el tipo de vacuna, la eficacia esperada, la cantidad de ADN a inocular y consideraciones logísticas (Reyes-Sandoval & Ertl, 2001).

Se han investigado diferentes métodos para mejorar la eficacia de las vacunas de ADN. Uno de estos métodos es la pistola genética (gene gun), que permite reducir drásticamente la dosis de la vacuna. Este proceso implica el acoplamiento del ADN a esferas de oro o tungsteno, las cuales se bombardean en la dermis y las capas subdérmicas con la ayuda de helio comprimido, facilitando la transfección directa de las células blanco (Bergmann&Leitner & Leitner, 2015; Huygen, 2005).

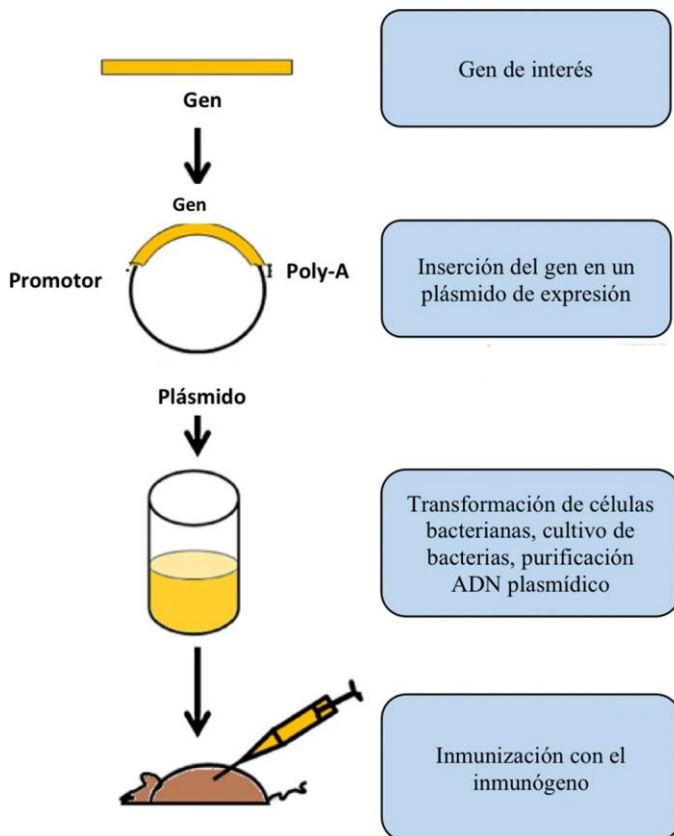
Otro método es la electroporación (EP), que implica la aplicación de pulsos eléctricos breves y de bajo voltaje a las células o tejidos justo después de la inyección de la vacuna. Este proceso temporalmente aumenta la permeabilidad de las membranas celulares, lo que facilita la entrada del ADN en las células objetivo (Cukjati et al., 2007).

Independientemente de la vía utilizada o método, diversas células reciben el ADN, siendo las células presentadoras de antígenos (APC) profesionales (macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y linfocitos B) las encargadas de recoger el ADN para la activación celular, dado que son las únicas células capaces de realizar esta función (Reyes-Sandoval & Ertl, 2001).

## Mecanismo de acción

Al igual que todas las vacunas, el mecanismo mediante el cual las vacunas de ADN generan

Figura 2. Proceso general para el desarrollo de una vacuna de ADN



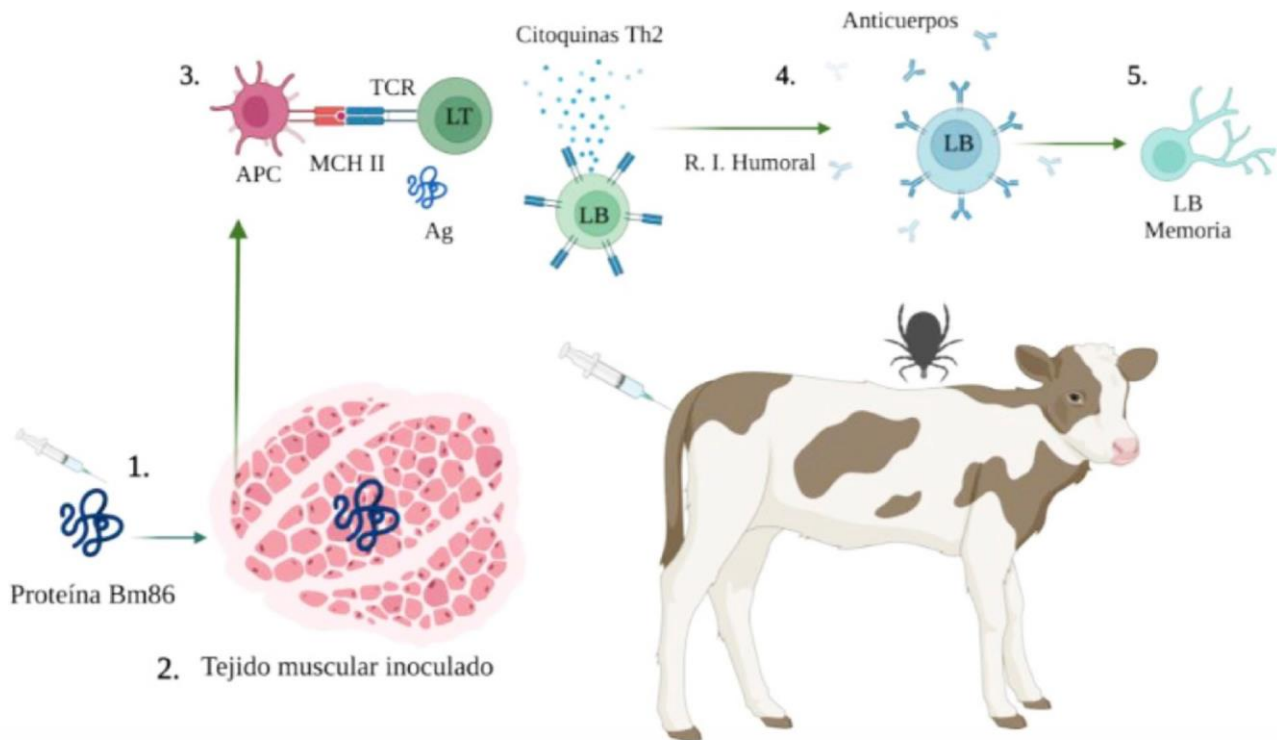
Esta representación destaca los pasos fundamentales en la producción de vacunas de ADN.

Fuente: Modificado de Yadav et al., 2014.

immunogenicidad es activando la respuesta inmune adaptativa. En este proceso, participan células inmunitarias especializadas y anticuerpos que atacan y destruyen antígenos, previniendo así futuras enfer-

MHC de clase II. Dependiendo del tipo de célula CD4+ que se una al complejo, las células B son estimuladas y se estimula la producción anticuerpos (Shedlock & Weiner, 2000; Mota-Sánchez, 2009).

Figura 3. Proceso general del funcionamiento de una vacuna de ADN



Fuente: Tomado de Galván et al., 2022.

medades al recordar (memoria inmunológica=formación de inmunoglobulinas específicas para cada antígeno) cómo eran esas sustancias y al generar una nueva respuesta inmunitaria. La duración de la inmunidad adaptativa puede variar, desde semanas y meses hasta, en algunos casos, toda la vida.

Cuando un plásmido se inyecta debajo de la piel o el músculo del huésped, penetra en la célula y se transloca al núcleo, donde comienza la transcripción del transgén. Los transcritos se transportan al citoplasma, donde son traducidos por los ribosomas, y posteriormente procesados en pequeños péptidos antigénicos por las proteasas del huésped, estos péptidos ingresan a la luz del retículo endoplásmico (RE) a través de transportadores asociados a membrana. Los péptidos se unen a moléculas del MHC de clase I (Hewitt, 2003, Mota-Sánchez, 2009, Yadav et al., 2014). La proteína exógena también puede ser presentada por el MHC vía clase II por células presentadoras de antígenos (APC), que activan células T auxiliares CD4+. Estas células CD4+ son capaces de reconocer los péptidos formados a partir de proteínas exógenas que fueron endocitados o fagocitados por APC y degradados a fragmentos de péptidos cargados en moléculas de

Esta representación visual destaca las etapas clave del mecanismo de acción de una vacuna de ADN. Desde la introducción del plásmido en la célula hasta la presentación de péptidos en la superficie celular y la activación de los linfocitos T cooperadores (CD4+), así como la activación de los linfocitos B para la producción de anticuerpos y la generación de memoria inmunológica.

### Avances en Medicina Veterinaria

Actualmente, se han autorizado vacunas de ADN para uso veterinario, contra el virus del Nilo Occidental en caballos (Davidson et al., 2005), la necrosis hematopoyética infecciosa en bancos de salmones (Garver et al., 2005) y el melanoma canino en perros (Pellin, 2022), así como Clynav contra la infección por enfermedad del páncreas en el Atlántico en salmón (Røsaeg et al., 2021). Además, la primera vacuna comercial de ADN contra el H5N1 en pollos ha sido recientemente aprobada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), que se dirige a la influenza aviar H5 altamente patógena (AgriLabs, 2018; Jazayeri & Poh, 2019).

## CONCLUSIONES

Las vacunas de ADN tienen la capacidad de estimular respuestas inmunitarias específicas mediante la inoculación directa del material genético, ofreciendo ventajas notables en términos de producción y eficacia. Si bien, se han logrado avances significativos en el desarrollo de vacunas de ADN, es fundamental

reconocer que algunas de ellas aún se encuentran en fase de desarrollo y evaluación. Su implementación clínica requiere de más investigación para abordar desafíos, como mejorar la optimización de la inoculación del ADN y mejorar el tiempo de respuesta inmune. A medida que continúan las investigaciones, las vacunas de ADN podrían desempeñar un papel importante en la mejora de la salud en animales.

## REFERENCIAS

- AgriLabs (2018). *First DNA vaccine licensed for chickens*. Disponible en <https://www.prnewswire.com/news-releases/first-dna-vaccine-licensed-for-chickens-300554855.html>, [marzo 2024].
- Babiuk, L. A., Babiuk, S., Loehr, B. I. & Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S. (2000). Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76(1-2), 1-23. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(00\)00198-7](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(00)00198-7).
- Bermejo, G. C. (2012). Un momento de reflexión acerca de las vacunas. *Sanidad Militar*, 68(2): 109-114. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712012000200009>.
- Bergmann-Leitner, E. S. & Leitner, W. W. (2015). Vaccination using gene-gun technology. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1325, 289-302. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2815-6\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2815-6_22)
- Cheung, Y., Cheng, S. C., Sin, F. W. & Xie, Y. (2004). Plasmid encoding papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA constructed with codon optimization improved the immunogenicity against HPV infection. *Vaccine*, 23(5): 629-638. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.010>.
- Cukjati, D., Batiuškaitė, D., André, F., Miklavčič, D. & Mir, L. M. (2007). Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy. *Bioelectrochemistry (Amsterdam)*, 70(2): 501-507. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.11.001>.
- Davidson, A., Traub-Dargatz, J. L., Rodeheaver, R. M., Ostlund, E. N., Pedersen, D. D., Moorhead, R. G., Stricklin, J. B., Dewell, R. D., Roach, S. D., Long, R. E., Albers, S. J., Callan, R. J. & Salman, M. (2005). Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, 226(2): 240-245. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.240>.
- Frelin, L., Ahlén, G., Alheim, M., Weiland, O., Barnfield, C., Liljeström, P. & Sällberg, M. (2004). Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Therapy (Basingstoke)*, 11(6): 522-533. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302184>.
- Froger, A. & Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *Journal Of Visualized Experiments*, (6):253 <https://doi.org/10.3791/253>.
- Galván Arellano, D. M., Vieyra Reyes, P., Montes de Oca Jiménez, R., Ortega Lopez, J., Martínez Arzate, S. G., Rivas Santiago, B. & Vázquez Chagoyán, J. C. (2023). Proteína Bm86 y su potencial uso como vacuna contra garrapatas en el ganado bovino. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 14(3): 672-695. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i3.6255>.
- Garver, K. A., LaPatra, S. E. & Kurath, G. (2005). Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook Oncorhynchus tshawytscha and sockeye O. nerka salmon. *Diseases Of Aquatic Organisms*, (64): 13-22. <https://doi.org/10.3354/dao064013>.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends In Biotechnology (Online)*, 22(7): 346-353. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>.
- Hewitt, E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110(2): 163-169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x>.
- Huygen, K. (2005). Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect*; 7(5-6):932-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2005.03.010>.
- Jazayeri, S. D. & Poh, C. L. (2019). Recent advances in delivery of veterinary DNA vaccines against avian pathogens. *Veterinary Research (Print)*, 50(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0698-z>.
- Kowalczyk, D.W., Ertl, H.C.J. (1999). Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol Life Sci*, 55(5):751-70. <https://dx.doi.org/10.1007/s000180050330>.

- Kutzler, M. A. & Weiner, D. B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*, 9(10): 776-788. <https://doi.org/10.1038/nrg2432>.
- Loera-Valenzuela, P.B., López-Ortiz, C., Romero-Vela, C.D., Luévanos Escareño, Miriam, Balagurusamy, N. (2016). Mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos en bacterias. *Revista Medicina de Torreon*, 8(2). 67-76.
- López Monteon, A., Hurtado Melgoza, M.D. & Ramos Ligonio, A. (2013). ¿Qué sabe Ud.? acerca de... las vacunas de ADN? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(1): 79-81.
- Lu, S., Manning, S. & Arthos, J. (2003). Antigen Engineering in DNA Immunization. En *Humana Press eBooks* (pp. 355-374). <https://doi.org/10.1385/1-59259-688-6:355>.
- Montgomery, D. L., Shiver, J. W., Leander, K., Perry, H. C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J. B., Donnelly, J. & Liu, M. A. (1993). Heterologous and Homologous Protection Against Influenza A by DNA Vaccination: Optimization of DNA Vectors. *DNA And Cell Biology*, 12(9): 777-783. <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.777>.
- Mota-Sánchez, J. (2009). Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Publica de Mexico*, (51): s463-s469. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342009000900012>.
- Pellin, M. A. (2022). The Use of Oncept Melanoma Vaccine in Veterinary Patients: A Review of the Literature. *Veterinary sciences*, 9(11): 597. <https://doi.org/10.3390/vetsci9110597>.
- Ramakrishna, L., Anand, K. K., Mohankumar, K. M. & Ranga, U. (2004). Codon Optimization of the Tat Antigen of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Generates Strong Immune Responses in Mice following Genetic Immunization. *Journal Of Virology*, 78(17): 9174-9189. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.17.9174-9189.2004>.
- Reyes-Sandoval, A. & Ertl, H. C. J. (2001). DNA vaccines. *Current Molecular Medicine*, 1(2): 217-243. <https://doi.org/10.2174/1566524013363898>.
- Røsæg, M. V., Thorarinnsson, R. & Aunsmo, A. (2021). Effect of vaccines against pancreas disease in farmed Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases (Print)*, 44(12): 1911-1924. <https://doi.org/10.1111/jfd.13505>.
- Shedlock, D. J. & Weiner, D. B. (2000). DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of leukocyte biology*, 68(6): 793-806.
- Srivastava, I.K., Liu, M.A. (2003). Vacunas genéticas. *Ann Intern Med*, 138(7):550. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-138-7-200304010-00011>.
- Tang, D. D., De Vit, M. J. & Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 356(6365): 152-154. <https://doi.org/10.1038/356152a0>.
- Wang, S. & Lu, S. (2013). DNA immunization. *Current Protocols in Microbiology*, 31(1): 8.3.1-18.3.24. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc1803s31>.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949 Pt 1):1465-8. doi: 10.1126/science.1690918.
- Yadav, D. K., Yadav, N. & Khurana, S. M. P. (2014). Vaccines. En *Elsevier eBooks*. pp. 491-508. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416002-6.00026-2>.

# DE LA PARASITOLOGÍA DE AVES SILVESTRES A LA PATOLOGÍA DE ANÉLIDOS TERRESTRES

# FROM THE PARASITO- LOGY OF WILD BIRDS TO THE PATHOLOGY OF TERRESTRIAL ANNELIDS

Salgado-Miranda C.,<sup>1</sup> Soriano-Vargas E.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

\* Autor de correspondencia: soriano@uaemex.mx

## RESUMEN

Como la mayoría de los organismos vivos, las lombrices de tierra o anélidos terrestres, son parasitados por microorganismos. En estudios parasitológicos de aves silvestres que se alimentan de estos pequeños animales, ocasionalmente se pueden observar parásitos de las lombrices ingeridas. Aquí, se presentan hallazgos histopatológicos en la lombríz de tierra asociados con la infección de *Monocystis* sp.

**Palabras clave:** Lombríz de tierra, anélidos terrestres, aves, parásitos.

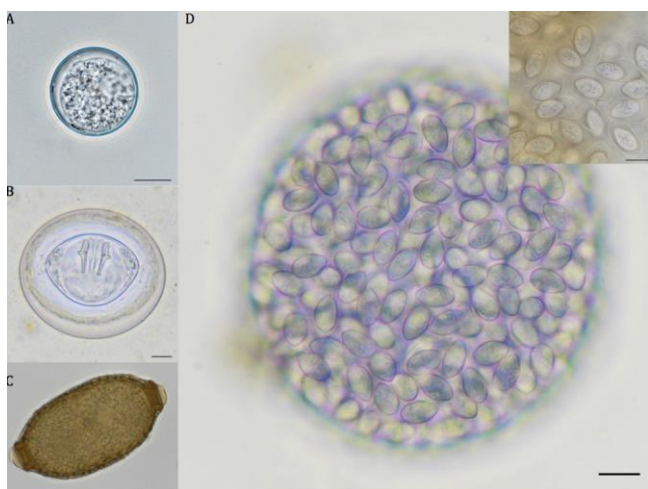
## Abstract

The earth worms or terrestrial annelids are parasited by infectious microorganisms as similar as other living organisms. In parasitological studies of worm-eating wild birds, coccidial parasites are occasionally observed in the fecal samples. Here, the histopathological findings in *Monocystis* sp.-infected earth worms, are showed.

**Key words:** Earth worm, terrestrial annelids, wild birds, parasites.

En el estudio del estado de salud de las poblaciones de aves silvestres, además de los parámetros morfométricos, se toman muestras para estudios hematológicos, bacteriológicos, parasitológicos e histopatológicos. De manera particular, la identificación de enteroparásitos se realiza mediante la identificación del microorganismo o a partir de los huevos u ooquistes. En general, estas estructuras son identificables fácilmente. Sin embargo, también es común encontrar estructuras similares a las antes mencionadas y que escapan a la pronta identificación, como es el caso de las gregarinas (figura 1).

Figura 1. Estructuras reconocibles en muestras fecales de aves silvestres



A, ooquiste no esporulado de *Isospora*; B, huevo de cestodo; C, huevo de nematodo; D, ooquiste de gregarina (*Monocystis* sp.) con numerosos esporozoites. E, Barra = 10  $\mu$ m. Fuente: Elaboración propia.

## LAS GREGARINAS

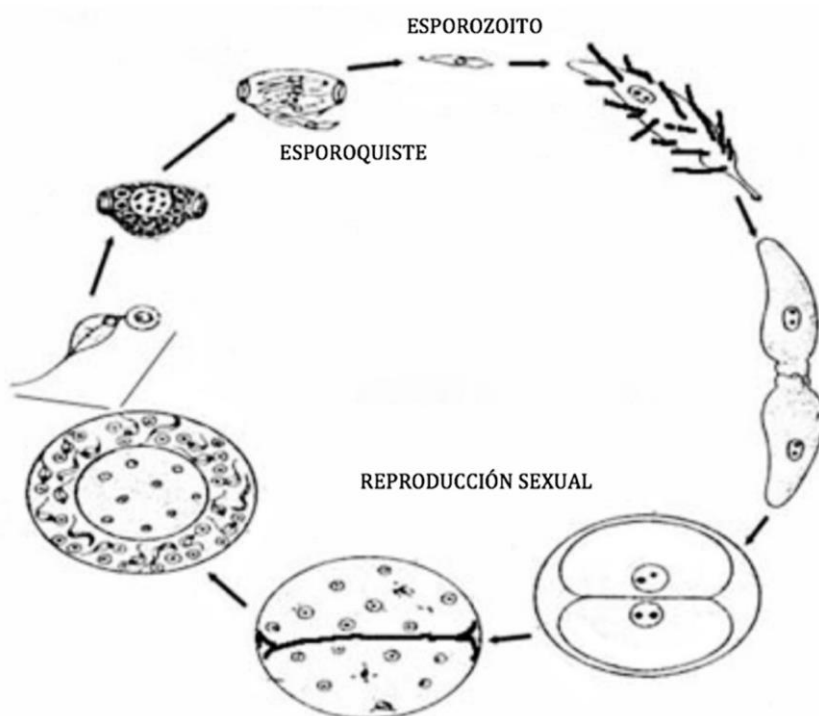
Los Apicomplexa son un grupo de eucariontes unicelulares, parásitos de humanos y animales, tanto vertebrados como invertebrados. Los Apicomplexa más importantes se dividen en cinco grupos principales: gregarinas, hemogregarinas, coccidias, hemosporidias y piroplasmas (Levine, 1988). Algunos Apicomplexa de humanos y animales son ampliamente estudiados (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, entre otros), mientras que se tiene muy poco conocimiento de otros protozoarios patogénicos en diversas especies animales. De manera particular, las gregarinas se consideran el grupo más primitivo en el árbol filogenético de los Apicomplexa. Infectan el tubo digestivo, cavidad celómica y órganos reproductivos de invertebrados de

agua dulce, marinos y terrestres: gusanos, moluscos, artrópodos, equinodermos y tunicados (Reyes Villanueva, 2004). La gran mayoría de las gregarinas son monoxenos (parásitos que cumplen su ciclo de vida en un hospedero único). Debido a su gran tamaño (200 a 600  $\mu$ m), los esporozoites contienen cientos de esporas y son conspicuos al microscopio (figura 1). En general, se tiene muy poco conocimiento de las gregarinas, las cuales se distribuyen ampliamente y son relevantes en la reconstrucción de la historia evolutiva de los Apicomplexa (Simdyanov et al., 2017).

## INFECCIÓN DE ANÉLIDOS TERRESTRES POR *MONOCYSTITIS* SP.

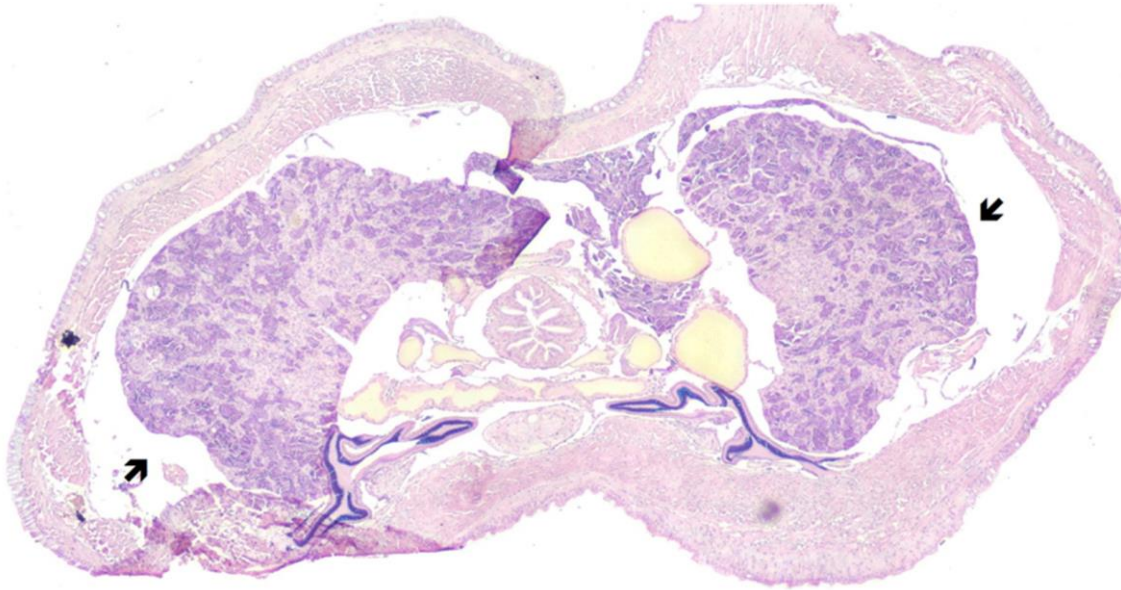
Como todos los organismos terrestres y acuáticos, la lombriz de tierra es parasitada por microorganismos infecciosos. Un grupo de gregarinas del género *Monocystis* infectan a estos invertebrados. Se estima que al menos 114 especies de *Monocystis* infectan a los anélidos terrestres (Kundu et al., 2023). En el estómago de la lombriz, el esporozoite (en forma de balón de fútbol americano) libera ocho (o más) esporozoites (figura 2). Los esporozoites recién eclosionados pasan a la cavidad celómica o se adhieren como parásitos extracelulares a las células epiteliales mesentéricas (Reyes Villanueva, 2004). De manera particular, *Monocystis* sp. infecta las vesículas seminales de la lombriz de tierra (figura 3) y se alimenta de una mórula de esperma mediante digestión enzimática y absorción de nutrientes (figura 4).

Figura 2. Ciclo de vida de *Monocystis* sp. en las vesículas seminales de la lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris*)



Fuente: Adaptado de Omoto y Cartwright (2003).

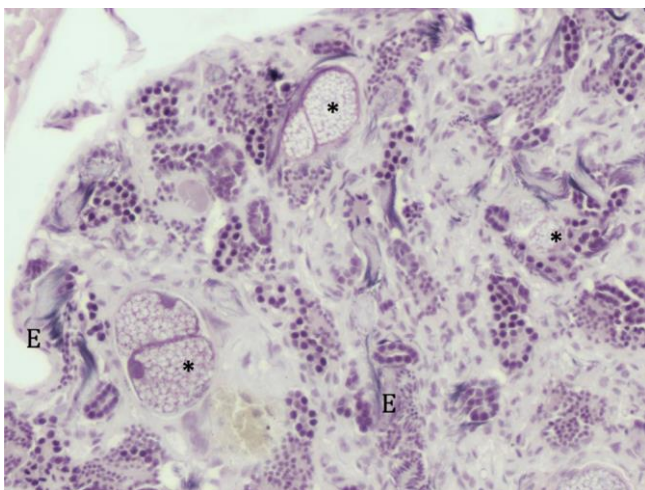
Figura 3. Lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris*). Vesículas seminales (flechas). Tinción hematoxilina-eosina. Barra = 500 µm



Fuente: Elaboración propia.

En lombrices de tierra infectadas con *Monocystis* sp. se ha registrado disminución de tamaño corporal, baja fecundidad y en casos de infección severa (hasta 34 900 000 esporoquistes/individuo), inclusive la muerte (Field et al., 2003; Field y Michiels, 2005). En la lombricultura, lo anterior puede ocasionar pérdidas económicas significativas (Field y Michiels, 2005).

Figura 4. Lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris*). Vesícula seminal. E, espermatozoides; gametoquistes (\*) de *Monocystis* sp. Tinción hematoxilina-eosina. Barra = 10 µm.

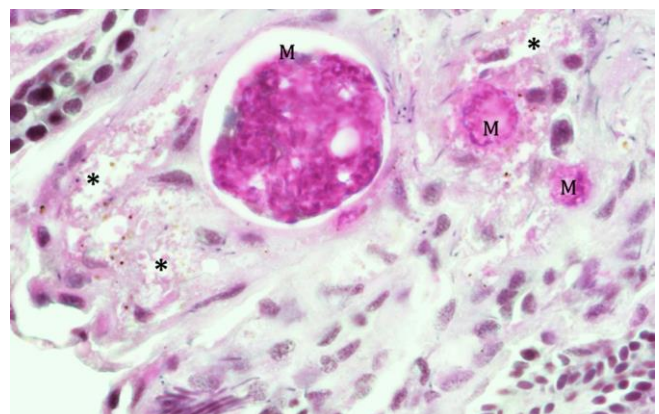


Fuente: Elaboración propia.

Los invertebrados han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa muy eficientes. A diferencia de la inmunidad adaptativa, la cual se basa en el reconocimiento de antígenos específicos por parte de linfocitos T, B y anticuerpos, y que se observa únicamente en vertebrados, muchos mecanismos de inmunidad innata se encuentran tanto en vertebrados como en invertebrados.

En los invertebrados, los mecanismos celulares de inmunidad innata incluyen reparación de heridas, fagocitosis de microorganismos y reacciones de encapsulamiento. Además, los invertebrados poseen una gama de factores antimicrobianos, por ejemplo, tipo lisozima, proteasas, péptidos antimicrobianos y cascadas enzimáticas (Bilej et al., 2010). Particularmente, en los celomocitos es relevante la catalización de melanina y enzimas microbicidas por la fenoloxidasas (homólogos de los leucocitos de los vertebrados) (Field et al., 2004).

Figura 5. Lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris*). Vesícula seminal. Necrosis (\*) circundante a gametocitos de *Monocystis* sp (M). PAS. Barra = 10 µm



Fuente: Elaboración propia.

## CONCLUSIONES

En conclusión, las características morfológicas de los ooquistes observados al microscopio permiten la identificación de *Monocystis* sp. en muestras coprológicas o incluso histológicas de intestinos de aves

silvestres insectívoras, particularmente comedoras de lombrices terrestres (figura 6).

Figura 6. Ejemplar de *Turdus rufiventris* subsp. *rufiventris* llevando lombrices a polluelos



Fuente: Fotografía de los autores.

## REFERENCIAS

- Bilej, M., Procházková, P., Sileroiva, M., Josková, R. (2010). Earthworm immunity. *Adv Exp Med Biol*, (708):66-79.
- Field, S.G., Kurtz, J., Cooper, E.L., Michiels, N.K. (2004). Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms. *J Inverteb Pathol*, 86(1-2):45-49.
- Field, S.G., Michiels, N.K. (2005). Parasitism and growth in the earthworm *Lumbricus terrestris*: fitness costs of the gregarine parasite *Monocystis* sp. *Parasitology*, 130(4):397-403.
- Field, S.G., Schirp, H.J., Michiels, N.K. (2003). The influence of *Monocystis* sp. infection on growth and mating behaviour of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Can J Zool*, (81):1161-1167.
- Kundu, B., Saha, M., Saha, S., Molla, S.H. (2023). Synopsis of the species of *Monocystis* von Stein, 1848 (Apicomplexa: Gregarinomorpha: Arthrogregarida) pathogenic to earthworms described so far. *J Parasit Dis*, (47):465-490.
- Levine, N.D. (1988). *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press, Boca Ratón.
- Omoto, C.K., Cartwright, D.C. (2003). Investigating the diversity of parasitic protozoa using gregarine parasites of invertebrates. In: *Tested studies for laboratory teaching*. ABLE 2003:77-85.
- Reyes Villanueva, F. (2004). Generalidades y potencial en biocontrol de las gregarinas entomoparásitas. *Ciencia UANL*, (7):355-360.
- Simdyanov, T.G., Guillou, L., Diakin, A.Y., Mikhailov, K.V., Schrével, J., Aleoshin, V.V. (2017). A new view on the morphology and phylogeny of eugregarines suggested by the evidence from the gregarine *Ancora sagittata* (Leuckart, 1860) Labbé, 1899 (Apicomplexa: Eugregarinida). *PeerJ*, 5:e3354.

# LINFADENITIS CASEOSA EN PEQUEÑOS RUMIANTES: CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD

# CASEOUS LYMPHADENITIS IN SMALL RUMINANTS: CHARACTERIZATION OF THE DISEASE

Jaimes-Gonzalez, M. G.,<sup>1,2</sup> Rodríguez-Domínguez, M. C.,<sup>1</sup> Velazquez-Ordoñez, V.,<sup>1,2</sup> Sánchez-Aparicio, P.,<sup>1</sup> Recillas-Morales, S.,<sup>1</sup> Montes De Oca- Jiménez, R.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, México.

\* Autor de correspondencia: romojimenez@yahoo.com

## RESUMEN

La Linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad de origen bacteriano que afecta a pequeños rumiantes de todo el mundo; sus formas de presentación son cutánea y visceral. La forma cutánea se caracteriza por el desarrollo de abscesos en los nódulos linfáticos superficiales y la forma visceral por la formación de abscesos en órganos internos como pulmón, hígado y riñón. La LAC provoca el deterioro progresivo de la condición física de los animales, y afecta negativamente la producción de carne, leche y lana. El objetivo de la presente revisión bibliográfica es realizar una breve descripción de la LAC en ovejas y cabras. Se realizó una búsqueda bibliográfica de trabajos dirigidos al estudio de la LAC en el mundo. Se concluye que la LAC sigue siendo una enfermedad prevalente en el mundo, los medios diagnósticos han evolucionado de manera paralela al desarrollo de la tecnología encontrándose ahora pruebas altamente sensibles y específicas; sin embargo, en cuanto a la vacunación continúan los esfuerzos para la generación de biológicos que confieran protección al 80% del rebaño.

**Palabras clave:** Linfadenitis caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, nódulos linfáticos, pequeños.

## Abstract

Caseous lymphadenitis (CLA) is a disease of bacterial origin that affects small ruminants worldwide; it has two forms of presentation: cutaneous and visceral. The cutaneous form is characterized by the development of abscesses in the superficial lymph nodes and the visceral form by the formation of abscesses in internal organs such as lung, liver and kidney. LAC causes progressive deterioration of the physical condition of the animals, and negatively affects the production of meat, milk and wool. The objective of the present literature review is to give a brief description of LAC in sheep and goats. A bibliographic search of works on the study of LAC in the world was carried out. It was concluded that LAC continues to be a prevalent disease in the world, the diagnostic means have evolved in parallel to the development of technology, finding now highly sensitive and specific tests; however, in terms of vaccination, efforts continue for the generation of biologicals that confer protection to 80% of the flock.

**Key words:** Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, lymph nodes, small ruminants.

## INTRODUCCIÓN

En ovinos y caprinos la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* conduce al desarrollo de lesiones piogranulomatosas en nódulos linfáticos superficiales y en órganos internos como pulmón, hígado y riñón, esta enfermedad se denomina Linfadenitis caseosa (Pointon et al., 2019). El potencial patógeno del agente se ve favorecido por la presencia de factores de virulencia determinantes para el desarrollo de la enfermedad en el hospedero. La identificación de moléculas que participan en la adhesión, invasión, colonización, propagación dentro del huésped y evasión del sistema inmunológico, es esencial para comprender los mecanismos de patogenicidad de este agente (Soares et al., 2013). El principal factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis* es la fosfolipasa D codificada por gen *pld*, promueve la degradación de la esfingomielina de las membranas de las células endoteliales del punto de infección y de los macrófagos, contribuyendo a la diseminación regional y sistémica de la bacteria (Rodríguez et al., 2021).

LAC se transmite por contacto directo, los animales infectados pueden eliminar la bacteria a través de la ruptura de abscesos. La infección inicia por la entrada del agente a través de heridas en la piel o mucosas, ocasionadas durante las prácticas de manejo como la esquila, corte de cola, y marcaje de orejas. La transmisión por aerosol es posible porque los animales con lesiones pulmonares pueden eliminar el patógeno a través del aire exhalado (Ruiz et al., 2020; Windsor, 2011). Posteriormente se disemina por vía hematógena y linfática comenzando el desarrollo de abscesos en los nódulos linfáticos más cercanos al sitio de infección. Las lesiones primarias presentan infiltración masiva de fagocitos (principalmente polimorfonucleares neutrófilos), esta fase corresponde a un proceso inflamatorio caracterizado por los signos clásicos de la reacción inflamatoria aguda como edema y elevación de la temperatura (Varela et al., 2018; Vilaplana et al., 2020). Microscópicamente los abscesos tienen un centro de necrosis licuefactiva, rodeados de tejido conectivo con fuerte infiltrado de células inflamatorias mononucleares y polimorfonucleares neutrófilos; puede tener diversas capas de infiltrado inflamatorio mixto y proliferación de tejido conectivo, lo que le confiere, al corte transversal un aspecto de “aros de cebolla” (Khanamir et al., 2023). Los abscesos en órganos parenquimatosos como el hígado, riñón, pulmón e inclusive en la glándula mamaria inician como lesiones piogranulomatosas y progresan a lesiones abscedativas (Torky et al., 2023). El tamaño de los abscesos es variable, oscilando entre 1 y 15 cm, con un promedio de 4,6 cm (Khanamir et al., 2023). La dureza del absceso

depende del tiempo de evolución y del grado de proliferación de tejido conjuntivo fibroso que constituye la cápsula del absceso. LAC conduce al deterioro progresivo de la condición física, un estudio reportó que el 80% de animales afectados presentaron una puntuación baja de condición corporal (<2), y el 23,13% presentaban anemia leve (Ruiz et al., 2020); por ello constituye una de las principales causas de eliminación de ovejas y cabras (O’Hara et al., 2021). La presentación visceral dificulta el diagnóstico, debido a la falta de signos clínicos aparentes, permitiendo que la enfermedad se propague dentro de los rebaños y entre ellos (Costa et al., 2020).

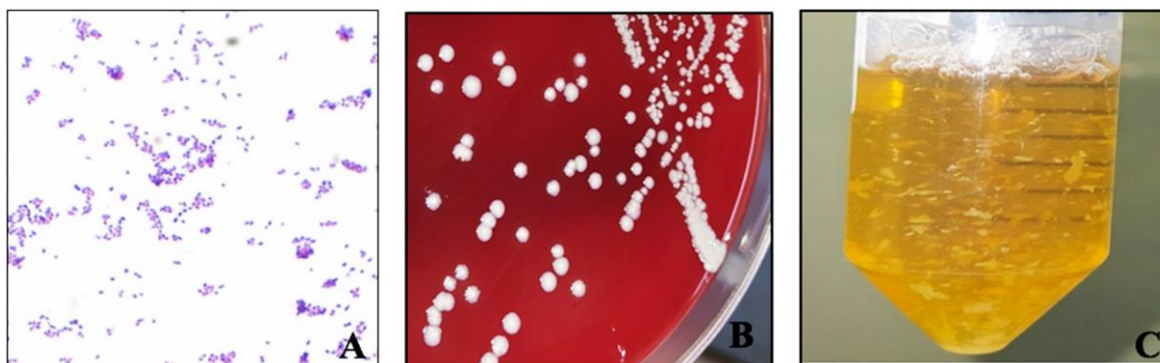
Dentro de las estrategias de prevención y control destacan el aislamiento de los animales clínicamente enfermos, el sacrificio y la vacunación de los rebaños (Yitagesu et al., 2020). El objetivo de la presente revisión bibliográfica fue recopilar información sobre LAC en el mundo. Considerando que el conocimiento y la divulgación sobre la presentación y diagnóstico de LAC contribuye a su oportuna detección por los productores, técnicos, médicos veterinarios zootecnistas y estudiantes interesados en la temática.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Linfadenitis caseosa

La Linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad de distribución mundial que impacta negativamente en las unidades de producción ovinas y caprinas; el agente causal es la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) biovar *ovis* (Dorella et al., 2006). *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* es un cocobacilo grampositivo (figura 1A), no esporulado, anaerobio facultativo que se aísla en medio de cultivo agar sangre (figura 1B) y presenta un mayor crecimiento en medio de cultivo líquido infusión cerebro corazón (BHI) (figura 1C). El tamaño de la bacteria varía de 0.5 µm a 0.6 µm de amplitud y 1.0 µm a 3.0 µm de longitud. Tiene la capacidad de crecer en anaerobiosis, degradar la galactosa, maltosa, L-y D-arabinosa y glucosa sin la producción de gas (Hussain et al., 2017). Por su capacidad de reducir nitratos se clasifica en dos biovars, aquellos que muestran la reducción de nitrato positiva corresponden al biovar *equi* y los aislamientos en los que se aprecia una reducción de nitrato negativa son identificados como biovar *ovis* (Schlicher et al., 2021).

Figuras 1A. *C. pseudotuberculosis* tinción de Gram con objetivo 100X. 1B. Crecimiento de *C. pseudotuberculosis* en placas de agar sangre. 1C. Crecimiento de *C. pseudotuberculosis* en tubos de BHI.



Fuente: Elaboración propia.

*Corynebacterium pseudotuberculosis* se ha aislado de productos lácteos como quesos frescos y maduros producidos a partir de leche no pasteurizada de ovejas y cabras (Langova et al., 2022), lo que representa un foco de infección para los humanos.

LAC cursa de manera crónica con dos formas de presentación cutánea y/o visceral (Yitagesu et al., 2020). La forma de presentación más común es la visceral seguido de la cutánea; mientras que un bajo índice de animales suele presentar una combinación de ambas formas clínicas (Ruiz et al., 2020). En un estudio realizado en una granja de cabras en Brasil el 74.57% (129/173) presentó un estado clínico asintomático y el 11.56% (20/173) signos clínicos característicos de LAC; el resto de los animales analizados fueron negativos a las pruebas serológicas (Nicoletti et al., 2023). Por otro lado, se han considerado factores de riesgo asociados a la incidencia de LAC, el sexo y la edad; siendo las hembras y los corderos recién nacidos quienes presentan mayores probabilidades de infección en comparación con los machos adultos. Estos resultados se asocian a la escasa inmunidad de los animales jóvenes y una prolongada permanencia de las hembras en los rebaños (Yitagesu et al., 2020).

La prevalencia real de LAC está subestimada, debido a que no es una enfermedad de declaración obligatoria. De acuerdo con estudios recientes en Irak, las tasas de prevalencia de *C. pseudotuberculosis* en ovejas y cabras fueron del 0,94% y 1,93%, respectivamente (Khanamir et al., 2023), en Etiopia se ha reportado una prevalencia de 18.8% (Yitagesu et al., 2020) y Portugal 34% (Costa et al., 2020). Por otro lado, México, Suiza y China han logrado la caracterización molecular de aislados provenientes de ovejas y cabras (Varela et al., 2018; Schlicher et al., 2021; Zhou et al., 2019).

## Sinología de la infección

LAC puede cursar dos formas clínicas: la externa también descrita como cutánea (figura 2), caracterizada por el desarrollo de abscesos en los nódulos linfáticos superficiales o en el tejido subcutáneo (Yitagesu et al., 2020). Se ha descrito el nódulo linfoide retrofaríngeo como el sitio de infección más frecuente; el nódulo linfoide pre-escapular y mamario también suelen verse comprometidos con frecuencia (Ruiz et al., 2020). En la manifestación visceral, se observa la formación de abscesos en los nódulos linfáticos mediastínicos y otros órganos como pulmón, hígado, riñón y glándula mamaria (Torky et al., 2023). Los nódulos linfáticos afectados pueden revelar diferencias de texturas incluido: pus espeso, diversos signos caseonecroticos y masas calcificadas. La presentación laminar o de aro de cebolla es más común en ovinos, mientras que los caprinos suelen presentar abscesos con pus espeso y caseificación (Khanamir et al., 2023).

Figura 2. Oveja pelifolk con Linfadenitis caseosa cutánea en región submandibular izquierda



Fuente: Fotografía de los autores.

## Diagnóstico de LCA en el rebaño

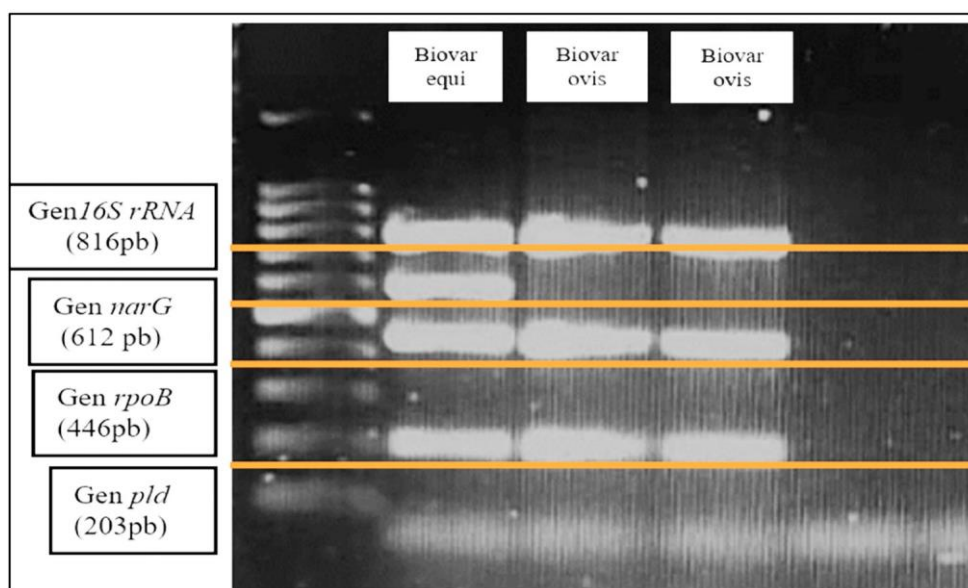
El diagnóstico de LAC se basa principalmente en la identificación de abscesos en nódulos linfáticos externos, animales con baja condición corporal y un exhaustivo examen clínico con especial atención en el sistema respiratorio (Ruiz et al., 2020). Una vez identificados los animales sospechosos deben ser separados para evitar la propagación (Burmayan y Brundage, 2021). La identificación y aislamiento de *C. pseudotuberculosis* se logra de manera exitosa en medios sólidos bajo condiciones de anaerobiosis durante 24 a 48 horas a 37 °C. Se han cultivado muestras de abscesos (pus) en distintos medios prefabricados como agar sangre, agar MacConkey, agar ácido naladixico de Columbia y agar sal de manitol. Sin embargo, se obtiene crecimiento de colonias puras color blanco amarillento, opacas,  $\alpha$ -hemolíticas y convexas en agar sangre y agar ácido naladixico Columbia (Terab et al., 2021). Respecto a la identificación molecular la técnica de

PCR suele ser la más utilizada buscando la amplificación de fragmentos de los genes *16S rRNA*, *pld*, *rpoB* y *narG* (Almeida et al., 2017) (figura 3). Los exámenes serológicos como el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) también suele ser común, por su alta especificidad del 98.7% y sensibilidad del 91% (Barral et al., 2019; Sting et al., 2022). Otros autores señalan la identificación de *C. pseudotuberculosis* mediante las características coloniales, examen microscópico, y la identificación bioquímica mediante las pruebas de catalasa, ureasa, reducción de nitrato, licuefacción de gelatina y la prueba negativa de lactosa (Galvão et al., 2017; Torky et al., 2023). El sistema API coryne es un conjunto de pruebas ampliamente utilizado para la clasificación bioquímica de *C. pseudotuberculosis*, permite diferenciar entre 49 especies de bacterias coryneformes, contiene 20 pruebas, 11 enzimáticas y 8 de utilización de hidratos de carbono (Almuzara et al., 2006; Varela et al., 2018). Además de la identificación bioquímica y molecular, la secuenciación genómica constituye una herramienta fundamental para el estudio de bacterias patógenas como *C. pseudotuberculosis*, específicamente para la identificación *in silico* de

genes relacionados con la virulencia y patogenicidad como el operón *fag* involucrado en la adquisición de hierro extracelular (Markova et al., 2024).

Otras bacterias pueden desarrollar abscesos en pequeños rumiantes, es por ello, que se deben considerar para un diagnóstico diferencial las siguientes: *Staphylococcus* sp., *Actinomyces pyogenes*, *Actinobacillus* sp., *Fusobacterium necrophorum*, *Streptococcus* sp. y *Enterococcus* spp. (Didkowska et al., 2020; Pépin et al., 2010).

Figura 3. Amplificación de genes por PCR cuádruplex para *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* y biovar *equi*



Fuente: Elaboración propia.

## Tratamiento antimicrobiano

Los abscesos en nódulos linfáticos superficiales deben ser drenados o retirados a través de cirugía y la inactivación del material purulento obtenido (Galvão et al., 2017). La sensibilidad antibiótica de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* ha sido ampliamente estudiada, demostrando que los antibióticos más activos correspondieron a los grupos de cefalosporinas, gluco-péptidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas. Mientras que los  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos muestran menor actividad (Gallardo et al., 2019). Estos datos coinciden con los reportados por Abebe y Tessema en 2015, donde los aislados de *C. pseudotuberculosis* fueron sensibles a los antibióticos norfloxacin, tetraciclina y kanamicina; sin embargo, se observó resistencia frente a ampicilina y clindamicina. El tratamiento de la LAC con antibióticos de alta sensibilidad no es una alternativa, debido a que las bacterias permanecen protegidas dentro de los abscesos por la gruesa cápsula de tejido conectivo que las rodea (Gao et al., 2018).

## Prevención y control

El control de LAC depende de la vacunación; sin embargo, la enfermedad puede persistir incluso después de periodos de vacunación (De Pinho et al., 2021). El desafío frente a esta problemática sanitaria es la generación de vacunas que confieran protección a más del 80% del rebaño. Recientemente se han logrado obtener de manera exitosa proteínas recombinantes como CP40 y PLD ambas considerados factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* y se postulan como candidatas a vacunas para su posterior desafío (Rodríguez et al., 2020). Otros factores de virulencia putativos de *C. pseudotuberculosis* (rNanH y rPknG) han sido evaluados como vacunas de subunidades recombinantes en el modelo murino, revelando mejores resultados; los ratones inmunizados con rNanH+saponina presentaron con una tasa de supervivencia del 60%, mientras que los inmunizados con rPknG + saponina una tasa de supervivencia del 20% (De Oliveira et al., 2020). La mayoría de las vacunas comerciales disponibles son formuladas por una combinación de antígenos de varios agentes patógenos, sin embargo, ninguna logra conferir protección total del rebaño, no impiden la infección, y presentan reacciones adversas con formación de abscesos cutáneos en el sitio de la inyección (Rodríguez et al., 2021). En México no existen biológicos comerciales contra la LAC, frente a este vacío el

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pesqueras (INIFAP) desarrolló una bacterina - toxoide, con base en una cepa de *C. pseudotuberculosis* aislada en México. Fue evaluada en campo en los estados de Veracruz, Puebla y Yucatán, demostrando la disminución de prevalencia de la LAC de un 10% a un 1.5% en un lapso de dos años de iniciado el programa de vacunación (Murguía y Morales, 2017).

## CONCLUSIONES

La Linfadenitis caseosa es una enfermedad que puede pasar desapercibida en ovejas y cabras, las afectaciones en órganos internos constituyen la forma de presentación más habitual dificultando el diagnóstico, volviendo a la enfermedad endémica dentro de los rebaños. LAC es la principal causa de eliminación de animales provocando importantes pérdidas económicas. La técnica de PCR es actualmente la prueba más utilizada para el diagnóstico de LAC. Por otro lado, a pesar de los esfuerzos para la identificación de candidatos vacunales, no se ha logrado obtener biológicos que confieran protección a más del 80% de los animales inoculados. Actualmente el estudio del agente etiológico de LAC se concentra en la evaluación de la respuesta inmune inducida por distintos factores de virulencia putativos de *C. pseudotuberculosis* e identificación de factores de virulencia.

## REFERENCIAS

- Abebe, D. and Sisay Tessema, T. (2015). Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. *Lett Appl Microbiol*, 61(5): 469-476.
- Almeida, S., Dorneles, E. M. S., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J., Carneiro, A., Bagano, P., Spier, S., Barh, D., Lage, A. P., Figueiredo, H., y Azevedo, V. (2017). Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC veterinary research*, 13(1), 290.
- Almuzara, M. N., De Mier, C., Rodríguez, C. R., Famiglietti, A. M. R., Vay, C. A. (2006). Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la identificación de bacilos gram-positivos difteroides de importancia clínica. *Rev Argent Microbiol*, 38(4): 197-201.
- Barral, T.D., Mariutti, R.B., Arni, R.K., Santos, A.J., Loureiro, D., Sokolonski, A.R., Azevedo, V., Borsuk, S., Meyer, R., Portela, R.D. (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microb Biotechnol*, 12(6): 1313-1323.
- Burmayan, A., Brundage, C.M. (2021). Caseous lymphadenitis outbreak in a small ruminant herd. *Open Vet J*, 11(4):530-534.
- Costa, L., Huerta, B., Galán, R.Á., Gómez, G.L., Almeida, A., Viegas, I. and Maldonado, A. (2020). Utility assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks. *Vet. Med. Sci.*, 6(4): 796-803.
- De Oliveira, T.S.M., Barros de Pinho, R., da Rocha, F.B., Silvestre, B.B.F, Severo, S. F., Kommling, S. F., Collares, T., Nascimento, J.M.R., Portela W.R., Carvalho A.V., Borsuk S. (2020). NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Vaccine*, 38(51):8099-8106.

- De Pinho, R.B., de Oliveira, S.M.T., Bezerra, F.S.B., Borsuk, S. (2021). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(6):2287-2296.
- Didkowska, A., Żmuda, P., Kwiecień, E., Rzewuska, M., Klich, D., Krajewska-Wędzina, M., Witkowski, L., Żychska, M., Kaczmarkowska, A., Orłowska, B., y Anusz, K. (2020). Microbiological assessment of sheep lymph nodes with lymphadenitis found during post-mortem examination of slaughtered sheep: implications for veterinary-sanitary meat control. *Acta veterinaria Scandinavica*, 62(1): 48.
- Dorella, F.A., Pacheco, L.G., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Rev Argent Microbiol*, 37(2):201-218.
- Gallardo, A.A., Toledo, R.A., González, P.R.A., Azevedo, V., Robles, C., Paolicchi, F.A., Estevao, B.S.G. (2019). *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis: Evaluation of antibiotics susceptibility in vitro. *Rev Argent Microbiol*, 51(4):334-338.
- Galvão, C.E., Fragoso, S.P., de Oliveira, C.E., Forner, O., Pereira, R.R.B., Soares, C.O., Rosinha, G.M.S. (2017). Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. *BMC Microbiol*, 17(1):202.
- Gao, H., Mam, Y., Shao, Q., Hong, Q., Zheng, G., Li Z. (2018). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain KM01, isolated from the abscess of a goat in Kunming, China. *Genome Announc*, 6(11): e00013-18.
- Hussain, R., Khaliq, S.A., Siddique, A.B., Khan, I.A., Hassan, M.F. y Younus, M. (2017). Clinico-pathological and bacteriological studies on caseous lymphadenitis in small ruminants. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(2): 437-442.
- Khanamir, R.A., Issa, N.A., Abdulrahman, R.F. (2023). First study on molecular epidemiology of caseous lymphadenitis in slaughtered sheep and goats in Duhok Province, Iraq. *Open Vet J.*, 13(5):588-598.
- Langova, D., Slana, I., Okunkova, J., Moravkova, M., Florianova, M., Markova, J. (2022). First Evidence of the Presence of the Causative Agent of Caseous Lymphadenitis-*Corynebacterium pseudotuberculosis* in Dairy Products Produced from the Milk of Small Ruminants. *Pathogens*, 11(12):1425.
- Markova, J., Langova, D., Babak, V., Kostovova, I. (2024). Ovine and Caprine Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* on Czech Farms-A Comparative Study. *Microorganisms*, 12(5):875.
- Murguía, O.M.L., Morales, A.J.F. (2017). Control y prevención de la linfadenitis caseosa en ovinos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Campo Experimental Mochochá. Folleto para productores, núm. 7. Mérida, Yucatán, México.
- Nicoletti, J.L., Braga, E.S., Stanicic, D., Jadranin, M., Façanha, D.A.E., Barral, T.D., Hanna, S.A., Azevedo, V., Meyer, R., Tasic, L., Portela, R.W. (2023). A serum NMR metabolomic analysis of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. *Appl Microbiol Biotechnol*, 107(14):4593-4603.
- O'Hara, K. C., Pires, A. F. A. and Martínez, L.B. (2021). Evaluating the association between climatic factors and sheep condemnations in the United States using cluster analysis and spatio-temporal modeling. *Preventive veterinary medicine*, (191), 105342.
- Pépin, M., Pardon, P., Marly, J. y Lantier, F. (1988). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. *American journal of veterinary research*, 49(4), 459-463.
- Pointon, A., Hamilton, D., Kiermeier, A. (2019). Comparison of postmortem inspection procedures for detecting caseous lymphadenitis of Australian sheep and goats. *Vet. Rec.*, (185)54.
- Rodríguez, D. M.C., Montes de Oca, J.R., y Varela, G.J.A. (2021). Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(4): 1221-1249.
- Rodríguez, D.M.C. (2020). Obtención y caracterización de las proteínas recombinantes PLD y CP40, factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ovis con potencial inmunogénico. (Tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Ruiz, H., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Baselga, C., Alzuguren, O., Tejedor, M.T., de Miguel, R., Lacasta, D. (2020). The Relevance of Caseous Lymphadenitis as a Cause of Culling in Adult Sheep. *Animals (Basel)*, 10(11):1962.
- Schlicher, J., Schmitt, S., Stevens, M.J.A., Stephan, R., Ghilmetti, G. (2021). Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated over a 15-Year Period in Switzerland. *Vet Sci*, 8(8):151.
- Soares, S.C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., Carneiro, A. (2013). The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. *PLoS ONE*, 8(1):e53818.
- Sting, R., Geiger, C., Rietschel, W., Blazey, B., Schwabe, I., Rau, J., Schneider-Bühl, L. (2022). *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infections in Alpacas (*Vicugna pacos*). *Animals (Basel)*, 12(13):1612.

Terab, A.M.A., Abdel, Wahab. G.E.D., Ishag, H.Z.A., Khalil, N.A.H., El Tigani-AsilETA, Hashem, F.M., Khalafalla, A.I., Shah, A.A.M., Al Muhairi, S.S.M. (2021). Pathology, bacteriology and molecular studies on caseous lymphadenitis in *Camelus dromedarius* in the Emirate of Abu Dhabi, UAE, 2015-2020. *PLoS One*, 16(6):e0252893.

Torky, H.A., Saad, H.M., Khaliel, S.A., Kassih, A.T., Sabatier, J.M., Batiha, G.E., Hetta, H.F., Elghazaly, E.M., De Waard, M. (2023). Isolation and Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Association with Proinflammatory Cytokines in Caseous Lymphadenitis Pyogranulomas. *Animals (Basel)*, 13(2):296.

Varela, G.J.A., Montes de Oca, J.R., Acosta, J.D., Hernández, F.L., Morales, E.V., Monroy, S.G.H. (2018). First report of isolation and molecular characterization of the pathogenic *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. *Microb Pathog*, (117): 304-309.

Windsor, P.A. (2011). Control of caseous lymphadenitis. *Vet. Clin. N. Am. Comida. Anim.* (27), 193-202.

Vilaplana, G.F., Tinkler, S., Sola, M., Miller, M., Heng, H.G. (2020). Radiographic and computed tomographic appearance of caseous lymphadenitis in a goat. *Vet Radiol Ultrasound*, 61(1): E6-E11.

Yitagesu, E., Alemnew, E., Olani, A., Asfaw, T., Demis, C. (2020). Survival Analysis of Clinical Cases of Caseous Lymphadenitis of Goats in North Shoa, Ethiopia. *Vet Med Int.* 8822997.

Zhou, Z., Yang, H., Li, H., Li, X., Li, X., Wu, B., Tian, S., Wu, J., Wang, Z., Hu, S. (2019). Sodium butyrate ameliorates *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in RAW264.7 macrophages and C57BL/6 mice. *Microb Pathog*, (131):144-149.

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO CRUDO DE LAS HOJAS DE *Eucalyptus globulus* Y *Aloe vera barbadensis* SOBRE *Staphylococcus aureus* AISLADOS DE VACAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA

*In vitro* ANTIMICROBIAL  
ACTIVITY OF THE CRU-  
DE EXTRACT OF THE  
LEAVES OF *Eucalyptus  
globulus* AND *Aloe vera bar-  
badensis* ON *Staphylococcus  
aureus* ISOLATED FROM  
COWS WITH SUBCLI-  
NICAL MASTITIS

Velázquez O.V,<sup>1,\*</sup> Ramírez Mendiola M.A,<sup>1,2</sup> Valladares C.B,<sup>1</sup> Bedolla C.C,<sup>3</sup> Acosta-Dibarrat J<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

<sup>2</sup> Becario de investigación SIEA-UAEM, México.

<sup>3</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

\* Autor de correspondencia :vvo@uaemex.mx

## RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos es una alerta de importancia sanitaria en la producción animal planteando la necesidad de desarrollar nuevas alternativas en la prevención y control de las enfermedades bacterianas en la población. Se evaluó la actividad *in vitro* de extractos crudos de *Aloe vera barbadensis* L y *Eucalyptus globulus* sobre *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis subclínica en hatos lecheros de producción familiar. La actividad antimicrobiana *in vitro* de los fitoextractos crudos se evaluó por el método de difusión en agar, empleando unidiscos impregnados con diluciones simples de los fitoextractos acuosos crudos (20% p/v), depositados sobre placas de agar Muller-Hinton inoculadas con *S. aureus*, que fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, para determinar el halo de inhibición de crecimiento bacteriano expresado en mm en las placas de agar. Los resultados se evaluaron por el método de los promedios ponderados a un 80% ( $p < 0.05$ ). El tratamiento de *Aloe vera barbadensis* mostró menor actividad *in vitro* ( $p < 0.05$ ) comparado con el *E. globulus* que mostró un halo de inhibición mayor ( $7 \pm 4$  mm). Se concluye que los extractos acuosos de *Eucalyptus globulus* y *Aloe vera barbadensis* L muestran actividad antimicrobiana diferencial *in vitro* sobre *S. aureus* indicando su potencial aplicación en el desarrollo de fitocompuestos con actividad antimicrobiana.

**Palabras clave:** *Aloe vera barbadensis*, *Eucalyptus globulus*, *Staphylococcus aureus*, vacas lecheras.

## Abstract

Antimicrobial resistance is an alert of health importance in animal production, raising the need to develop new alternatives in the prevention and control of bacterial diseases in the population. The *in vitro* activity of crude extracts of *Aloe vera barbadensis* L and *Eucalyptus globulus* on *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in small holders family dairy herds was evaluated. The *in vitro* antimicrobial activity of the crude phytoextracts was evaluated by the agar diffusion method, using units impregnated with simple dilutions of the crude aqueous phytoextracts (20% w/v), deposited on Muller-Hinton agar plates inoculated with *S. aureus*, which were incubated at 37°C for 24 h, to determine the of inhibition zone of bacterial growth expressed in mm on the agar plates. The results were evaluated by the method of weighted averages at 80% ( $p < 0.05$ ). The *Aloe vera barbadensis* treatment showed lower *in vitro* activity ( $p < 0.05$ ) compared to *E. globulus*, which showed a greater inhibition zone ( $7 \pm 4$  mm). It is concluded that the aqueous extracts of *Eucalyptus globulus* and *Aloe vera barbadensis* L show differential antimicrobial activity *in vitro* on *S. aureus*, indicating their potential application in the development of phytocompounds with antimicrobial activity.

**Key words:** *Aloe vera barbadensis* L, *Eucalyptus globulus*, *Staphylococcus aureus*, Dairy cattle.

## INTRODUCCIÓN

La prevalencia de *S. aureus* en los hatos lecheros de producción familiar es alta, posiblemente relacionadas con las condiciones de higiene del ordeño y manejo del hato, contribuyen al desarrollo de la mastitis en las vacas lechera (Manjarrez et al., 2012). Al disminuir el riesgo de infección glandular la salud de la glándula mamaria del ganado lechero y el riesgo de diseminación de cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos (Hendrikson et al., 2008). La presentación de cepas de *S. aureus* resistentes y multiresistentes a los antibióticos asociada a la expresión de la resistencia a meticilina implica una alerta y vigilancia en la salud pública (Aguayo-Reyes et al., 2018). La resistencia del *S. aureus* a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en los hatos lecheros se produce por diversos mecanismos, dentro de estos el más común la producción de  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan a las penicilinas simples y a la ampicilina (Hernández et al., 1991). Las cepas de *S. aureus* penicilinas no sensibles a la penicilinasa (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina y meticilina), se relacionan con cepas del antibiotipo oxacilina/meticilina resistentes (ORSA/MRSA), las cuales se han identificado como causante de mastitis subclínica en vacas lecheras, incrementando el riesgo a la salud pública por la emergencia de cepas resistentes a meticilina (MRSA), que establecen la posibilidad de ocurra una infección humana por contaminación de leche y sus derivados lácteos no pasteurizados (Lagunas, 2002). Actualmente las cepas MRSA son consideradas una alerta mundial en la salud, por la ocurrencia de infecciones hospitalarias y comunitarias que muestran alto grado de morbilidad y mortalidad (Lee, 2003).

Son parte de la herbolaria tradicional las plantas empleadas entre la población humana para el cuidado de la salud con un propósito terapéuticos (Farnsworth et al., 1985). Basado en el conocimiento empírico en las comunidades rurales, es posible orientar el estudio para identificar su actividad y desarrollar nuevos fitocompuestos como una alternativa de tratamiento (Sánchez et al., 2012). Al contener las plantas principios activos con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos (Farnsworth et al., 1985). Los nuevos fitocompuestos podrían ser aplicables en la medicina moderna (González et al., 2004), al evaluar nuevos sus compuestos y el efecto farmacológico sobre diversos problemas y padecimientos de la salud (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010). El amplio potencial etnobotánico de la herbolaria mexicana se identifica en diversas zonas del país, como una fuente en la posible búsqueda de sustancias para el desarrollo de nuevos fármacos (Oliveira et al., 2005).

El árbol del Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), clasificado en la familia Mirtáceas, del Género *Eucalyptus*

y la Especie: *glóbulus*. Es originario de Australia, tiende a desarrollarse como un árbol de altura de follaje perene de hojas colgantes, lanceoladas y brillantes, aromáticas ricas en aceites destilables y floración menuda. Las hojas contienen aceites esenciales compuestos por monoterpenos:  $\alpha$ - pineno, y para-cimeno como los principales aceites identificados, pequeñas cantidades de sesquiterpenos (Boom et al., 2018).

La sábila (*Aloe vera barbadensis* L), perteneciente al género *Aloe* y de la familia *Liliaceae*, se identifica en zonas del mediterráneo, África Nor-oriental y Sudáfrica, las Antillas y en la América Central (Gómez et al., 2001). La planta arvense puede tener una altura media de entre 50 a 80 cm, tiene hojas carnosas abultadas y agrupadas al centro con bordes espinoso-dentados con tallos de un diámetro de entre 30 y 40 cm. Producen flores tubulares, colgantes, rojas o naranja reunidas en forma de espiga y frutos capsulados (Martínez et al., 1996). De las numerosas especies identificadas del género *Aloe*, los beneficios han sido atribuidos a la salud se aprecian en el *A. vera barbadensis* L y *Aloe vulgaris* y (Castellanos et al., 2001; Pedroza, 2001; Vega et al., 2005). El conocimiento tradicional del efecto como remedio del *Aloe vera barbadensis* L, deriva de la aplicación tópica de la pulpa fresca de las hojas sobre heridas, abrasiones ulceraciones y quemaduras de la piel (Álvarez et al., 1996). La pulpa de las hojas frescas de *A. vera barbadensis* produce un gel y látex con amplia actividad biológica y farmacológica (García et al., 2001; Boudreau y Beland, 2006), su actividad biológica se ha relacionado con su contenido de manosa. Las condiciones de cultivo de la planta son importantes para determinar la composición del gel (Leung et al., 2004; Calzada y Pedroza, 2005), también se han descrito otros polisacáridos no tóxicos como la barbaloina o alantoína, aminoácidos, ácidos orgánicos, licoproteínas y polisacáridos, que exhiben un potencial antitumoral (Domínguez-Fernández et al., 2012). La actividad cicatrizante y antiulcerosa del *Aloe vera* se atribuye a los polímeros de carbohidratos como glucomanosa aunque es necesario profundizar en la fitofarmacología para establecer su potencial como posible medicamento (Eshun y He, 2004).

Este estudio se realizó para evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos crudos de *Eucalyptus globulus* y del *Aloe vera barbadensis*, sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de vacas con mastitis subclínica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La obtención de los materiales vegetativos de las plantas se realizó a inicios de la primavera en una zona aledaña a la ciudad de Zitácuaro, Michoacán. La recolección fue de aproximadamente 500 g de hojas

jóvenes del árbol de *E. globulus* y 2.5 kg de hojas frescas de sábila *A. vera barbadensis L.* Los materiales vegetativos se lavaron y sonetizaron; las hojas de árbol Eucalipto se secaron en un horno entre 20 y 25 °C durante 3 a 4 días, para posteriormente efectuar la molienda fina en un molino de alta velocidad. A las hojas de *Aloe* se les retiró el exocarpio la cubierta verde que separa la pulpa, para obtener una porción aproximada de un kilogramo. Los extractos crudos de las plantas se prepararon de forma similar.

A partir de una porción de 100 g de materia seca como soluto y mezclado en 400 mL del solvente (mezcla de agua destilada y metanol absoluto), en una proporción de 9:1 respectivamente. La preparación de cada uno de los sustratos se sometió a baño María durante 24 horas a 37 °C. El extracto se filtró con papel filtro (Whatman no. 4), empleando un embudo de cristal hasta lograr la completa separación del extracto crudo, la concentración del extracto se efectuó en baño María. Para evaluar la sensibilidad *in vitro*, se emplearon tres aislamientos de *S. aureus* ORSA/MRSA obtenidos de vacas lecheras con mastitis subclínica y dos cepas control de *S. aureus* ATCC 25923 y la ATCC 29213; las cuales se sometieron al ensayo de inhibición *in vitro* frente a los extractos de *Eucalyptus globulus* y *Aloe vera barbadensis L.*, mediante el método de Kirby Bauer modificado de difusión en agar Muller Hinton (Kirby et al., 1959). El ensayo se realizó a partir de la porción acuosa de cada uno de los extractos crudos; el inóculo se preparó con las cepas de *S. aureus* de trabajo y de control empleando una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente al 0.5 de la escala McFarland ( $10^6-8$  UFC/ml). Obteniendo el inóculo bacteriano con un hisopo humedecido de cada cultivo, extendidos sobre placas de agar Muller-Hinton, para depositar sobre la superficie de las placas de agar los unidiscos de papel filtro (Whatman no. 4) de 6 mm de diámetro, los cuales se impregnaron con 10, 20, 30, 40, 50 µl de cada uno extracto de prueba; teniendo como control negativo un unidisco impregnado con el solvente de preparación de los extractos crudos. Los ensayos *in vitro* se realizaron por triplicado, incubándose a 37 °C durante 24 y 48 h, las zonas claras de inhibición alrededor de los unidiscos indicaron actividad antimicrobiana, las zonas de inhibición se midieron y expresaron en milímetros. Los resultados se evaluaron a partir del diámetro de inhibición, al emplear el método estadístico de promedios ponderados ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

Al comparar la actividad *in vitro* de los extractos, se observó mayor capacidad antimicrobiana sobre el *S. aureus*, ORSA/MRSA del *E. globulus* al mostrar halos de inhibición de 2 mm a 7 mm. En comparación con el extracto de *Aloe vera barbadensis L.* con una actividad inhibitoria a concentraciones de 50µl en las cepas de control y los aislamientos de *S. aureus* (cuadro 1).

Cuadro 1. Sensibilidad *In vitro* de *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA frente a los extractos crudos de *Eucalyptus globulus* y *Aloe vera barbadensis L.*

Halos inhibición expresados en mm						
Extracto Crudo (µl)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923*	<i>S. aureus</i> ATCC 29213* A1	Aislamientos de <i>S. aureus</i> (ORSA/MRSA)			
			A2	A3		
<i>Eucalyptus globulus</i>	10µl	2	2	1	2	2
	20µl	4	4	4	4	4
	30µl	5	5	5	5	5
	40µl	6	6	6	6	6
	50µl	7	7	7	7	7
<i>Aloe vera barbadensis L.</i>	50µl	2	2	3	2	2

\*Oxacilina sensible, \*Oxacilina resistente. Halo de inhibición valores expresados en milímetros para las concentraciones de ambos extractos crudos mostraron diferencias entre columnas por tratamiento ( $p < 0.05$ ). No se observó actividad inhibitoria de *Aloe vera L.* a concentraciones menores de 50µl. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos indicaron un incremento de la actividad antimicrobiana, al aumentar la concentración del extracto de *E. globulus* mejoró la actividad inhibitoria frente a las cepas de control oxacilina sensible y oxacilina resistente, así como en los aislamientos del antibiotipo ORSA/MRSA. En comparación al tratamiento de *Aloe vera L.* en el cual se apreció una ligera actividad de inhibición a una concentración de 50µl del extracto crudo. Observándose un potencial para desarrollar posibles fitocompuestos con actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* ORSA/MRSA.

## DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Los resultados sugieren una potencial actividad antimicrobiana del extracto de *E. globulus*, que puede encontrar su aplicación experimental en el desarrollo de modelos biológicos. La sensibilidad *in vitro* de las cepas *S. aureus* ORSA/MRSA con el extracto de *E. globulus* es consistente al analizar los resultados obtenidos en otros países al evaluar otras especies de eucaliptos; los resultados derivados del estudio difieren de las otras

investigaciones debido a que los ensayos se llevaron a cabo en diferentes condiciones de los tratamientos (Alvarado-Aguilar et al., 2019). Otros autores han observado también un efecto antibacteriano en los extractos de hojas de contra *S. aureus*. (Takahashi et al., 2004). El extracto crudo de *Aloe vera* que en el estudio *in vitro* mostró una actividad antimicrobiana menor que el *E. maculata* en otros estudios se le ha atribuido una actividad biológica con efecto antiviral favorable, diferente al mostrado como bactericida (Carlini, 1988), efecto relacionado posiblemente a los polisacáridos presentes en los preparados (Ni et al., 2004; García et al., 2001).

El efecto antibacteriano observado en la cicatrización de heridas se ha evidenciado en la planta de

*Aloe*, además se ha descrito que el jugo de las hojas frescas tiene actividad antimicrobiana tópica, al evaluar su acción sobre *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium xerosis*; también el jugo de las hojas resulta activo sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris* (Sánchez-Monge, 1980). En otro estudio se comparó el efecto inhibitor del crecimiento bacteriano del *Aloe vera* sobre *S. aureus*, obteniéndose una ligera actividad inhibitoria al ser comparado contra la estreptomocina (Martínez et al., 1996). Se concluye que el extracto de *Eucalyptus globulus* mostró actividad antimicrobiana contra los aislamientos de *S. aureus* ORSA/MRSA obtenidos de vacas lecheras con mastitis subclínica.

## REFERENCIAS

Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., Domínguez, M., González-Rocha, G. (2018). Bases moleculares de la resistencia a metilina en *Staphylococcus aureus*. *Rev chil Infectol*, 35(1):7-14. <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>.

Alvarado-Aguilar, J., Vásquez-Montenegro, V., Vergara-Espinoza, M., Santa Cruz-López, C. (2019). Efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Staphylococcus aureus*. *Revista Experiencia en Medicina (Lambayeque)*, 5(3):119-125.

Álvarez, A., Ramos, I., Robaina, Y., Pérez, G., Cuevas, M., Carrillo, C. (1996). Efecto antiulceroso de fórmulas que contienen extracto de aloe L. (SABILA). *Rev Cubana Plant Med*, 1(3): 31.

Boudreau, M.D. and Beland. F.A. (2006). An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (miller), *Aloe vera*. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.*, 24(1): 103-154.

Boom, E.A., Orozco, J.A., Alean, J.D., Rojano, B. (2018). Evaluación de la Actividad Antioxidante de Aceites Esenciales de Eucaliptos Cultivados en Colombia. *Información tecnológica*, 29(6), 57-66. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000600057>.

Carlini, J. (1988). Las plantas medicinales. Simposio de Plantas Medicinales de Brasil (Resumen). Sao Paulo, Brasil.

Castellanos-Puerto, E., Rodríguez-Acosta, M.M., Vázquez-González, T., Sin-Mayor, A. (2001). Efecto antiviral del extracto acuoso de *Aloe barbadensis* contra el virus de la hepatitis B. *Rev cubana Plant Med*, 6(1): 7-11.

Calzada, R.A.M. and Pedroza, S. A. (2005). Evaluación físico-química del gel y jugo de la hoja de sábila (*A. barbadensis* M.) en diferentes prácticas de manejo. *Revista Chapingo. Serie Zonas Áridas*. 4(2):93-101.

Domínguez-Fernández, R.N., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Welte-Chanes, J.S., Alvarado-González, J.S., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V., Gutiérrez-López, G.F. (2012). El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1): 23-43. Disponible en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S166527382012000100003&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S166527382012000100003&lng=es), [consultado el 12 de septiembre de 2024].

Eshun, K. and He, Q. (2004). *Aloe vera*: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries-a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44(2): 91-96.

Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(6):965-981.

García, A., Vizoso, A., Ramos, A., Pilot., J., Pavón, V., Rodríguez, E. (2001). Estudio toxicogenético de un polisacárido del gel de *Aloe vera* L. *Rev cubana Plant Med*, 6(2): 52-55.

Gómez, F., Vivas, L., Santa María, S. (2001). Prácticas de cultivo y algunos factores edafológicos que podrían influir sobre la calidad del gel de sábila. *Rev Chapingo, Serie Zonas Áridas*, 2(2): 68-73.

González, E.M., López, E.L.I., González, E.M.S., Tena F.J.A. (2004). *Plantas medicinales del Estado de Durango y zonas aledañas*. Instituto Politécnico Nacional (IPN): Durango.

Hendrikson, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Meunier, D., Butaye, P., Francisco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stärk, K., Berghold, C., Myllyniemi, A.L., Wasyl, D., Sunde, M., Aarestrup, F.M. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet Scand*, 50(28):1-10.

Hernández, A.L., Chávez, A.E., Pérez, D.M. (1991). Sensibilidad Antimicrobiana y producción de  $\beta$ -lactamasa en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa aislados de mastitis bovina. *Vet. Mex.*, 22(4): 290-294.

Kirby, W.M.M., Bauer, A.W., Perry, D.M. (1959). Single-Disk antibiotic-sensitivity testing of *Staphylococci*. *Arch Intern Med*, 104(2): 220-241.

Lagunas, B.S. (2002). Detección del gen *mecA* en *Staphylococcus aureus* metilina resistente por el método de reacción en cadena de la polimerasa en muestras de leche de vacas lecheras. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UAEM., Toluca, México.

Lee, J.H. (2003), Meticilin Oxacilin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Am Soc Microbiol*, 69(11):6489-6494.

Leung, M.Y., Liu, C., Zhu, L.F., Hui, Y.Z., Yu, B., Funget, K.P. (2004). Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.), Berg. *Glyco-biology*, 14(6): 501-510.

Manjarrez-López, A.M., Díaz-Zarco, S., Salazar-García, F., Valladares- Carranza, B., Gutiérrez-Castillo, A del C., Barbabosa-Pliego, A., Talavera-Rojas, M., Alonso-Fresán, M. U., Velázquez-Ordoñez, V. (2012). Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. *Rev Mex Cienc Pecu*, 3(2):265-274. Disponible en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-), [consultado el 13 de septiembre de 2024].

Martínez, M.J., Betancourt, B.J., Alonso, G.N. (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Aloe vera* (SABILA). *Rev Cubana Plant Med*, 1(3):18-20.

Ni, Y., Turner, D., Yates, K.M., Tizard, I. (2004). Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *Inter Immunopharmacol*, 4(14): 1745-1755.

Oliveira, M. A., Velázquez, D., Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos actuales, *Interciencia*, 30(8):453-459.

Pedroza, A. (2001). La Sábila: Un cultivo de perspectiva en la Comarca Lagunera. *Rev Agropec Lag*, (2):18-23.

Sánchez, N., Bu Wong, M., Pérez, H., Lara, G., Scull, I. (2012). Efecto del zumo de *Morinda citrifolia* L. (noni) en modelos de analgesia. *Rev Cubana Plant Med*, 17(3):213-216. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_issuetoc&pid=1028-479620120003&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=1028-479620120003&lng=es&nrm=iso), [consultado el 15 de enero de 2016].

Sánchez-Monge, E. (1980). *Diccionario de plantas agrícolas*. Madrid: Editorial Ministerio de Agricultura.

Schlaepfer, L. and Mendoza-Espinoza, J.A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Rev Mex Cienc Farmac.* (41): 18-27. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57916060003>, [Consultado 01 de septiembre 2024].

Takahashi, T., Kokubo, R., Sakaino, M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Lett Appl Microbiol*, 39(1):60-64 doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01538.x.

Vega, G.A., Ampuero, C.N., Díaz, N.L., Lemus, M.R. (2005). El *Aloe Vera* (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Rev chil nutr.*, 32(3):208-214. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182005000300005>.

# BASES PARA LA PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS

## REVISTA ELECTRÓNICA NUEVA ÉPOCA VETERINARIA

Los resultados de investigaciones científicas, desarrollos tecnológicos, casos clínicos, revisiones de literatura, artículos de divulgación o técnicos, deberán ser enviados vía correo electrónico a [revnevt\\_fmvyz@uaemex.mx](mailto:revnevt_fmvyz@uaemex.mx). La información debe ser capturada en un procesador de textos con fuente arial, tamaño 12, interlineado 1.5, preferentemente en el formato de texto Word para Windows o Mac (.doc, .docx) y deberá cumplir con los lineamientos establecidos por el Comité Editorial, cuyas bases se indican a continuación: Elementos gráficos (cuadros y figuras): Incluidos en el cuerpo del manuscrito, dentro del texto, usando títulos, encabezados y/o según sea el caso, indicar el pie de cuadro para explicar abreviaturas y parámetros estadísticos.

Secciones del manuscrito en función al tipo de manuscrito.

Investigación científica (Extensión máxima de 6,000 palabras sin contabilizar la literatura citada)

- Título español: Claro e informativo. Título en inglés: Claro e informativo.
- Autor(es): Apellido paterno, Apellido Materno e Inicial(es) Nombre(s).
- Adscripción: Indicado con un número en super-índice antes de cada autor; y en la siguiente línea posterior al título indicar la universidad u organización, departamento, ciudad y estado de adscripción.
- Autor correspondiente: Colocar un asterisco (\*) y en la siguiente línea posterior al título indicar el correo electrónico de contacto.

- Resumen Español: Hasta un máximo de 300 palabras que incluya el contexto de la investigación, objetivo, breve descripción de métodos, síntesis de resultados y conclusión. Resumen inglés: Hasta un máximo de 300 palabras.
- Palabras clave: De 3 a 6 palabras y que estén relacionadas con el estudio.
- Introducción: Es necesario que se indique el problema por resolver, revisar brevemente artículos relevantes y que finalice con el objetivo general del estudio.
- Materiales y Métodos: Detallar lo mejor posible, a fin de que otros investigadores, puedan replicar el estudio, citar las técnicas o métodos de trabajo.
- Resultados
- Discusión
- Conclusión: Indicar una conclusión breve, no mayor a un párrafo, resaltando el hallazgo más importante.

Literatura Citada: Sistema Vancouver con Digital Object Identifier (DOI) y el nombre abreviado de las revistas para listar las referencias en los artículos.

### INSTRUCCIONES GENERALES

El formato fue propuesto por el International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), y es el más utilizado en las publicaciones de las Ciencias de la Salud. Además, el formato Vancouver es el más compatible con los principales sistemas de indización, como Scopus, Web of Science y SciELO, y está disponible en

múltiples gestores electrónicos de bibliografía como Mendeley, Zotero y EndNote.

Revisión de literatura, artículo de divulgación o técnico (Extensión máxima de 4000 palabras sin contabilizar la literatura citada)..

- Título en español y Título en inglés.
- Autor(es): Apellido paterno, Apellido Materno e Inicial (es) Nombre(s). Adscripción: Indicando con un número en superíndice antes de cada Autor correspondiente: Indicar correo electrónico de contacto.
- Resumen Español, Resumen Inglés, Palabras clave, Introducción, Resultados, Discusión y Conclusión.
- Literatura Citada: Sistema Harvard.

### FORMATO:

1. Nombre, dirección y correo electrónico del autor o responsable.
2. La configuración de la página será papel tamaño carta (ancho 21.59 cm alto 27.94 cm), margen superior 2.5 cm, inferior 2.5 cm, izquierdo 3.0 cm y derecho 3.0 cm.
3. Para todo el documento la fuente (tipo de letra) Times New Roman a 12 puntos y sin ningún efecto.
4. Mayúsculas para los nombres de los autores, las instituciones y al inicio de cada párrafo.
5. Interlineado a 1.5.

Tabulación predeterminada al inicio de cada párrafo (1.25 cm sangrías).

1. Dejar un espacio o línea en blanco al final de cada párrafo.
2. Encabezado y pie de página limpios.
3. Solamente una sección y a una columna (sin salto de secciones).
4. Para todo el documento con orientación vertical.
5. Cada artículo con una imagen (como archivo o para capturar) por hoja.
6. Las imágenes o cuadros deberán estar con un formato en línea con el texto y no deberán exceder los márgenes establecidos.

### PARA REVISIÓN:

1. Se aceptarán artículos inéditos, revisiones de literatura, resultados preliminares de investigación, resultados de tesis de licenciatura y posgrado, investigación formativa, reportes y temas de literatura en general y artículos de divulgación.
2. Se aceptan también notas de literatura en general, notas informativas, caricaturas, dibujos y fotografías (no ofensivas y sin daño a la moral).
3. Cuando se presenten cuadros y gráficos deben ser en el menor número posible, señalando título y notas a pie de cuadro.
4. Las notas de investigación deben de ser breves y con objetivo definido, pueden consistir en modificación de alguna técnica, informes de casos clínicos o zootécnicos y notas preliminares.
5. Las revisiones de literatura se aceptarán siempre y cuando representen temas relevantes y de utilidad en el ejercicio profesional.
6. En la redacción se respetarán las normas internacionales relativas a las abreviaturas, símbolos, nomenclatura anatómica, zoológica, botánica, química, etc. Así como el sistema de unidades.
7. Las referencias de los libros en la bibliografía deberán contener los siguientes datos, de preferencia en este mismo orden: nombre del autor, año de la edición, título del libro (subrayado), editorial, ciudad, año de edición y número de páginas.
8. Las referencias de capítulos en la bibliografía deberán contener los siguientes datos, de preferencia en el mismo orden: nombre del autor, título del capítulo (entre comillas); ficha completa del libro de donde se extrajo y páginas donde se encuentra el capítulo.
9. Las referencias hemerográficas deberán contener los siguientes datos, de preferencia en este orden: nombre del autor; título del capítulo (entre comillas); título de la publicación (subrayado); año, volumen (vol.) y número (núm.) de la publicación; mes de la publicación y páginas en que se encuentra el artículo.

10. Las fichas bibliográficas y hemerográficas en notas en pie de página deberán ir completas en la primera cita y a partir de la segunda, indicarse sólo con alguno de los datos o las siguientes abreviaturas:

- Se indica op.cit. (obra citada) después del apellido del autor cuando el libro haya sido citado.
- Ibidem, Ibid. (allí mismo) e idem. (el mismo, lo mismo), se utilizan cuando el libro ya ha sido citado en la nota inmediatamente anterior.
- Se agregan algunas de las abreviaturas más usadas, especialmente en notas a piede página y bibliografía.
- et al. (y otros) se utiliza para indicar que una obra está firmada por varios autores, además del que se indica.
- Comp. o comps. (de compilador o compiladores) coord. o coords (de Coordinador o Coordinadores) v.g. (por ejemplo) cf. o cfr. (véase o confróntese).
- cap (capítulo).
- Supra (arriba).
- ed. (edición).
- infra (abajo).
- s.e. (sin editor).
- i.e. (esto es).
- s.f. (sin fecha).
- circa (alrededor de).
- s.l (sin lugar de edición).
- loc. cit. (locución citada).
- mimeo. (mimeografiado).
- passim (en varios lugares).
- pról. (prólogo).
- vid (véase).
- introd. (introducción).
- sic (así, textualmente).
- trad. (traducción).
- ed. o eds. (de editor o editores).
- s. (y siguiente)
- ss.(siguientes)

## REVISTA ELECTRÓNICA NUEVA ÉPOCA VETERINARIA

Se entregarán con tiempo, en orden y de manera íntegra los archivos y las imágenes por capturar, con una copia impresa para revisar, quedando los autores y revisores de cada artículo como responsables de la ortografía y gramática.

La responsabilidad del contenido de la información corresponde en su totalidad a los autores correspondientes y coautores de cada apartado.