



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Txertaketa errepikakorren
ostean ardiaren barean emandako
aldaketa transkriptomikoen
identifikazioa**

*Aitor Guisasola-Serrano,
Martin Bilbao-Arribas,
Endika Varela-Martínez,
Naiara Abendaño, Marta Pérez, Lluís
Luján eta Begoña M. Jugo*

105-112 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.12>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Txertaketa errepikakorraren ostean ardiaren barean emandako aldaketa transkriptomikoen identifikazioa

Aitor Guisasola-Serrano¹, Martin Bilbao-Arribas^{1,2}, Endika Varela-Martínez¹,
Naiara Abendaño¹, Marta Pérez³, Lluís Luján³, Bego M. Jugo¹

¹*Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU*

²*Terapia Genikoa eta Gene-Adierazpenaren Erregulazioa Programa, CIMA Nafarroako Unibertsitatea, IdiSNA*

³*Animalien Patologia Saila, Albaitaritza Fakultatea, Zaragozako Unibertsitatea*

aitor.guisasola@ehu.eus, begonamarina.jugo@ehu.eus

Laburpena

Bere mekanismo molekular zehatza guztiz argi ez egon arren, aluminio hidroxidoa (AH) txerto-laguntzaile gisa erabili izan da denbora luzez. Lan honetan ardiaren barean emandako erantzun transkriptomikoa aztertu dugu, animaliak AH txerto-laguntzailearekin txertoekin eta AH bakarrik era errepikakorrean txertatu ondoren. Animaliei tratamendu desberdinak aplikatu ondoren, Txerto taldea Kontrol eta AH taldeekin konparatzean lorturiko diferentzialki adierazitako geneak erretikulu endoplasmatikokoaren estresarekin, erantzun immunitarioarekin eta ziklo zelularrarekin erlazionatuta zeudela ikusi zen. AH bakarrik eragin transkriptomiko txikia erakutsi zuen barean. Aurkikuntza hauek AHan oinarritutako txerto-laguntzaileen mekanismo molekularra argitzen dute eta osagai antigenikoen garrantzia azpimarratzen dute.

Hitz gakoak: aluminio hidroxidoa, txerto-laguntzaileak, transkriptoma, diferentzialki adierazitako geneak, ardia, barea.

Abstract

Aluminum hydroxide (AH) has long been employed as a vaccine adjuvant although its precise mechanism of action remains unclear. In this study, we investigated the transcriptomic responses in sheep spleen following repetitive vaccination with AH adjuvanted vaccines and AH alone. After applying different treatments to sheep, among the differentially expressed genes in the Vaccine group compared to both Control and Aluminum groups, many were associated with endoplasmic reticulum stress, immune response and cell cycle. AH-alone treatment had little impact on the spleen transcriptome. These findings shed light on the molecular mechanisms of AH based adjuvants and emphasize the significance of antigenic components.

Keywords: aluminum hydroxide, vaccines adjuvants, transcriptome, differentially expressed genes, sheep, spleen.

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun gaixotasun infekziosoekiko txertaketak garrantzi handia du bai gizakietan baita animalietan ere. Gaur egungo nekazaritza eta etxe-abereen hazkuntza ezingo litzateke mantendu txertaketarik gabe (Tomley eta Shirley, 2009). Iberiar penintsulan bereziki ardi hazkuntza sail ekonomiko garrantzitsua denez, ardien osasuna lehentasun bat da eta ardiak etengabe gainbegiratzen dira eta gaixotasun infekziosoak prebenitzeko txertaketa kanpainak egiten dira. Aluminioan oinarritutako txerto-laguntzaileak daramaten txerto inokulatuen kopuruak gora egin du urteetan zehar (Luján et al., 2013). Horretaz gain, gero eta ezagunagoa den osasun bakarra (One Health) kontzeptua aipagarria da. Kontzeptu honen arabera, gizakion osasuna zentzu zabal batean mantentzeko, animalien ongizatea mantentzea ezinbestekoa da (Pitt eta Gunn, 2024). Hortaz, animalien osasunak berebiziko garrantzia du, eta horren barruan gaixotasun infekziosoekiko txertaketak eta berarekin lotutako txertoen hobekuntzak.

Txerto-laguntzaileak txertoetan itu-antigenoarekin batera inokulatzen diren eta horien aurrean organismoaren erantzun immunitario espezifikoarekin areagotzen duten konposatuak dira (He et al., 2015). 1926an deskribatu ziren lehen aldiz, zaldietan eginiko esperimendu batean. Esperimendu horretan kusi zuten zaldietan inaktibatutako difteria toxoide bat eta erlazionatu gabeko beste substantzia batzuk (ogi-apurak kasu) batera inokulatzean, inokulazio-gunean abzesuak garatzen zirela, toxoidearen aurkako erantzun immunitario hobetua eraginez (Glenny et al., 1925). Aurkitu zirenetik, hainbat konposatu probatu dituzte, hala nola bakterioen metabolitoak, azido nukleikoak edo liposomak, txerto laguntzaile gisa erabil daitezkeen aztertzeke (Petrovsky and Aguilar, 2004).

Txerto-laguntzaile gisa erabiltzen diren konposatuen artean aluminioan oinarrituak daudenak dira ohikoenak, eta horien artean aluminio hidroxidoa (AH) da erabiliena (Petrovsky eta Aguilar, 2004). Urteetan zehar segurtasun-erregistro on bat dutela erakutsi duten arren, aluminio-gatzak ahulak dira beste txerto-laguntzaileekin alderatuta, eta zelulen bidezko immunitatea eragiteko laguntzaile ahulak direla ikusi da (O'Hagan et al., 2001). Hala ere, txertoaren administrazio-bidearen arabera, AHak ere erantzun immunitario indartsua eragin dezakeela frogatu da (Ghimire, 2015), zelulen bidezko erantzuna (Th1 erantzuna) edo antigorputzen ekoizpenaren bidezko erantzuna (Th2 erantzuna) izan daitekeena (He et al., 2015). Kasu gutxi batzuetan txertoen ostean ondorio kaltegarriak ikusi dira, hala nola IgEren ekoizpena eta alergenikotasuna handipena; giltzurrun-funtzioarekin erlazionatutako aluminioaren metaketaren murrizketa, garuna eta hezur ehunak eraginez edo erreazio autoimmuneen indukzioa (Petrovsky eta Aguilar, 2004; Danielsson eta Eriksson, 2021). Hala ere, ez dago argi efektu horien kausa AH bera denik (Reed et al., 2013).

AH txerto-laguntzaile erabilienean izan arren, oraindik bere mekanismo molekularra ez dago guztiz argi eta hori argitzeko egindako ikerketa gehienak *in vitro* egin dira edo faktore mugatuetan zentratu dira. Sistemen biologiarren ikuspegitik faktore guztien konbinazioaren efektua erabat aztertzeke dago (He et al., 2015). Gene-multzo espezifikoaren adierazpen selektiboak erantzun immunitario guztiak modulatzeko ditu (Nicholson, 2016). Gainera, geneen sinadurak identifikatzeak txertoek eragindako erantzun immunitarioak argitzen eta indartzen lagun dezake, jadanik sukar horiaren aurkako txertoan gertatu den bezala (He et al., 2015). Horregatik, sistema biologikoen analisi transkriptomikoa (RNA desberdinen adierazpenaren azterketa) AHn oinarritutako txerto-laguntzaileen efektupean, hurbilketa garrantzitsua izan liteke haren mekanismo molekularrak zehazteko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

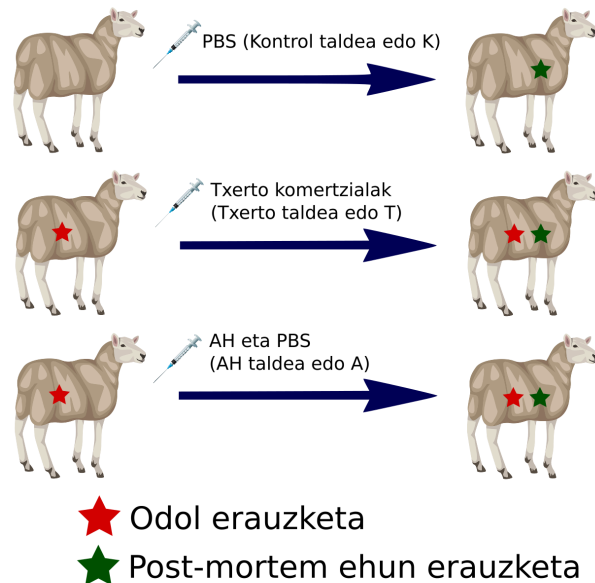
Albaitariak, immunologok eta genetikako adituek parte hartzen zuten lankidetzaren proiektu baten esparruan (AGL2013-49137-C3-3-R MINECO proiektua), epe luzeko esperimendu bat burutu zen, ardien txertaketa errepikakorrak *in vivo* duen eragina aztertzeke. Animaliei era errepikakorrean AH txerto-laguntzaileekin txerto komertzialak edo AH bakarrik inokulatu zitzaizkien (1. irudia). Gure ikerketa-taldeak jadanik aztertu ditu, RNAREN sekuentziazioaren (RNA-seq) teknika erabiliz, esperimenduko tratamenduen eragin transkriptomikoa bi ehunetan: odol periferikoko nukleo bakarreko zeluletan (PBMCetan) eta entzefaloan (Varela-Martínez et al., 2018; Varela-Martínez et al., 2020). PBMCetan, bai txertoek, bai AH soilik sistema immunologikoa suspertzen zuten. Entzefaloan, erantzuna ez zen hain indartsua izan, eta aldaketa geniko handiagoa ikusi zen AHrekin bakarrik tratatutako ardietan. Era berean, bi ehunetan adierazitako RNA ez kodetzaile luzeak (lncRNA-ak) aztertu genituen, eta ikusi genuen PBMCetan erantzun immunitarioarekin loturiko lncRNA-ak eta entzefaloan funtzio neurologikoei lotutako lncRNA-ak era diferentzialean adierazten zirela tratamendu desberdinetan (Bilbao-Arribas et al., 2021; Varela-Martínez et al., 2020).

Txertaketaren helburu nagusia antígeno baten aurkako erantzun immunitario espezifiko bat sortzea da eta erantzun hori, orokorrean, organo linfoide sekundarioetan garatzen da, hala nola, barean (Nicholson, 2016). Hori dela eta, organo linfoide sekundario horietan txertoek eta AHk duten eraginaren azterketa argigarria izan liteke aluminioan oinarritutako txerto-laguntzaileen mekanismo molekularren eta eragindako erantzun immunitarioaren ikerketan.

Aurreko guztia kontuan izanik, lan honetan ardiaren barean aluminio txerto-laguntzailea duten txerto komertzialak edo AH bakarrik era errepikakorrean jaso duten ardien bareako transkriptoma aztertu nahi dugu. Modu honetan ikusi nahi dugu zeintzuk diren era diferentzialean adierazitako

geneak eta inplikaturako prozesu eta bidezidor molekularrak. Lan honetan lortu nahi diren helburuak ondokoak dira: hasteko, txerto komertzialak era errepikakorrean jaso dituzten ardien bareako transkriptoma aztertzea, tratamendurik jaso ez duten ardienarekin konparatuz; bestetik, soilik AH era errepikakorrean jaso duten ardien bareako transkriptoma aztertzea, tratamendurik jaso ez duten ardienarekin parekatuz.

1. irudia: Txertaketa errepikakorra aztertzeko ardian eginiko epe luzeko esperimenduaren diseinua. Izar gorriek odolaren erauzketa uneak erakusten dituzte, PBMCak aztertzeko erabili zena. Izar berdeek ehunen erauzketa uneak erakusten dituzte, jadanik aztertutako entzefaloa eta lan honetako barea erauzi ziren uneak, hain zuzen ere.



3. Ikerketaren muina

3.1 Laginen bilketa eta geneen kuantifikazioa

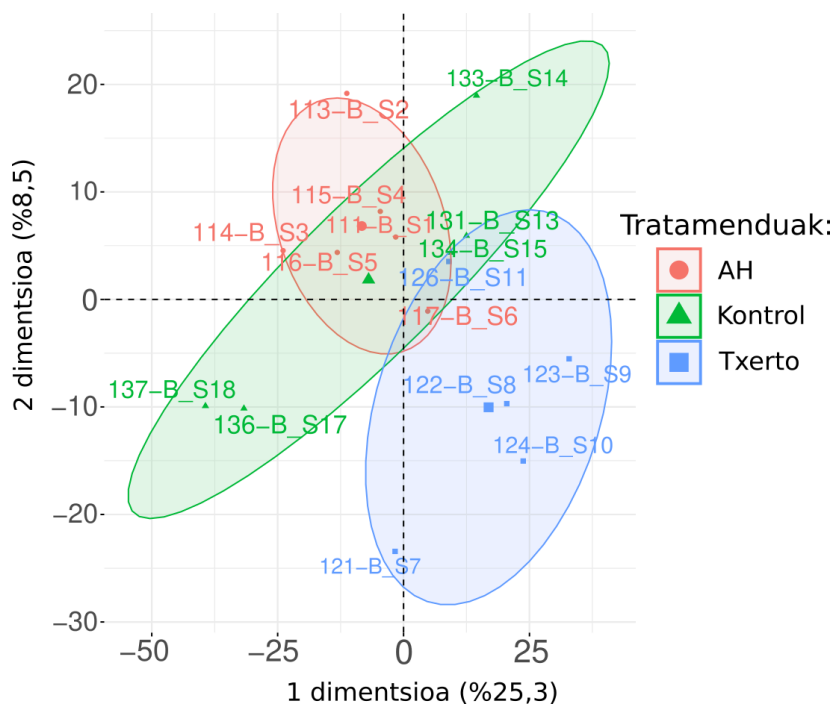
Zaragozako Unibertsitateko Etika Komiteak esperimendu guztien prozedurak onartu zituen (erreferentzia: PI15/14), Espainiar estatuko eta Europar Batasuneko animalien babeserako legediaren eskakizunak betez. Rasa Aragonesa leinu puruko hiru hilabeteko 21 bildots aukeratu eta 7 bildotseko hiru taldeetan banatu ziren. Talde batek AH txerto-laguntzaile bezala zeramaten txerto komertzialak jaso zituen (Txerto taldea). Bigarren taldeak soilik AH jaso zuen, aurreko taldearen dosi baliokidean (AH taldea). Azken taldeak fosfato gatzdun tanpoia (PBS) soilik zeramaten inokulazioak jaso zituen (Kontrol taldea). Ardiek 19 inokulazio jaso zituzten 475 egunetan zehar (2015eko otsailetik 2016ko ekainera arte). Gramo bateko ardien barearen laginak nekropsia momentuan hartu ziren.

Laginak sekuentziatu baino lehen, erauzitako RNAREN kalitatea aztertu zen, RNAREN integritate-zenbakia (RIN) erabiliz. RIN balioa 7,5 baino altuagoa zuten laginak hautatu ziren. Laginen RNA sekuentziatu ostean kalitate baxuko irakurketak, adaptadoreak eta sekuentzia erribosomikoak kendu ziren Trimmomatic eta BBTools programa bioinformatikoak erabiliz. Pausu honek lagin guztietan sekuentziatu ziren batez besteko 118.13 ± 4.5 milioi irakurketatik 111.24 ± 4.6 milioi irakurketara murriztea eragin zuen, hau da, % 94 irakurketa mantendu ziren batez beste. Kallisto programa erabiliz irakurketa horiek guztiak ardiaren genoma eguneratuenaren erreferentziazko sekuentzia laburren aurka lerrokatu ziren, hau da, pseudo-lerrokatu ziren. Irakurketen $43.41 \pm 1.47\%$ pseudo-lerrokatu ziren batez beste.

Osagai nagusien analisisa (PCA) egin ostean, sekuentziaturiko bi lagin (135-B eta 127-B) beste lagin guztietatik isolatuta agertu zirenez, baztertu egin ziren, hau da, outlier teknikat hartu ziren.

Kuantifikatu ziren 24866 geneetatik 17385 genek adierazpen filtroa pasa zuten. Laginak kendu ostean beste PCA bat osatu zen (2. irudia). Bertan Kontrol eta AH taldeak gainjarri egiten zirela ikusi genuen. Baita ere, Txerto taldea ondo desberdintzen zela ikusi genuen. Honek iradokitzen digu AH eta kontrol taldeetako ardien bareako transkriptoma antzekoa dela eta, AHaz gain txertoa bere osotasunean josotako ardien barean, profil transkriptomiko desberdin bat ikus daitekela.

2. irudia: AH, Kontrol eta Txerto taldeetako laginekin egindako osagai nagusien analisisa (PCA). PCA sortzeko aldakortasun handiena azaltzen duten bi dimentsioak erabili ziren (Guisasola-Serrano et al.-etik moldatua, 2024).



3.2 Diferentzialki adierazitako geneen detekzioa

Deseq2 izeneko programa bioinformatikoa erabilia, hiru tratamenduak binaka konparatuz aztertu ziren, diferentzialki adierazitako geneak (DAG) detektatzeko. DAG gehienak Txerto eta AH arteko erkaketan (TvsA) lortu ziren: 109 gainadierazitako (GA) gene eta 79 azpiadierazitako (AA) gene (188 DAG guztira). Txerto eta Kontrol taldeen arteko konparazioan (TvsK) 90 DAG lortu genituen, horietatik 44 GA geneak eta 46 AA geneak ziren. TvsA eta TvsK erkaketan artean 48 DAG partekatzen zirela ikusi zen. AH eta Kontrol taldeen arteko konparazioan (AvsK) azpiadierazitako bi DAG bakarrik detektatu ziren.

1. taulan ikus daitekeen bezala, TvsA eta TvsK konparazioetan zuzendutako p-balio baxuena duen genea SELENOK izan zen. SELENOK erretikulu endoplasmolikoaren (EE) estresarekin eta erantzun immunearekin erlazionatutako gene bat da. TvsA konparazioko DAG guztien artean zenbait gene detektatu ziren erantzun immunearekin (SERPINB1, MZB1 edo S100A9) eta ziklo zelularrarekin (CDCA8 edo E2F2) lotuta. TvsK erkaketan detektatu ziren geneak antzeko funtzioak betetzen zituztela ikusi genuen.

TvsA eta TvsK erkaketetako DAG-en antzekotasunak eta AvsK konparazioko DAG urriak, PCAk aditzera ematen zuen bezala, AH eta Kontrol tratamenduak ardiaren barean eragin transkriptomiko nahiko antzekoa dutela erakusten dute. Honek guztiak iradokitzen du txertoa bere osotasunean egon behar dela, hau da, antigenoaren presentzia beharrezkoa dela barearen transkriptoman erantzun bat ikusi ahal izateko. Epe luzeko esperimendu honetako beste ikerketa batean nodulu linfatiko preeskapularreko aluminioa neurtu zen hiru taldeetan (Asín et al., 2019). Lan honetan ikusi zuten soilik Txerto taldean aluminioa makrofagoen bitartez translokatzeko zela noduluetara, ez ordea Kontrol

eta AH taldeetan. Barea eta noduluak, biak organo linfoide sekundarioak izanik, antzeko translokazio prozesu bat izan behar dutela ondoriozta dezakegu.

1. Taula: Zuzendutako p-balio txikiena duten lehen 10 Gainadierazitako (GA) eta azpiadiazitako (AA) geneak Txerto eta AH taldeen arteko konparazioan eta Txerto eta Kontrol taldeen arteko konparazioan.

Ez da AH eta Kontrol arteko erkaketa azaltzen, soilik 3 DAG detektatu baitziren. Izenaz gain, gene bakoitzaren adierazpena zenbat aldiz aldatzen den erakusten duen balioa (log2 Fold Change edo log2FC) eta zuzendutako p-balioak azaltzen dira taulan (Guisasola-Serrano et al.-etik moldatua, 2024).

GA geneen izenak	GA geneen log ₂ FC	GA geneen zuzendutako p-balioa	AA geneen izenak	AA geneen log ₂ FC	AA geneen zuzendutako p-balioa
Lehen 10 DAGak Txerto eta AH taldeen arteko konparazioan					
SELENOK	0,62	6,05E-05	FAM181A	-1,24	3,42E-04
SERPINB1	1,03	6,05E-05	LOC121817230	-0,67	8,98E-04
FTL	8,57	8,94E-05	LOC121817744	-1,31	1,10E-03
CDCA8	1,04	5,24E-04	LOC121820202	-1,51	1,50E-03
HSP90B1	0,58	1,00E-03	TMEM44	-0,77	3,08E-03
LOC11410968	1,09	1,15E-03	RYR1	-0,82	3,91E-03
NUF2	0,76	1,29E-03	LOC121818741	-0,80	3,96E-03
CCNF	0,62	1,47E-03	C17H4orf33	-0,61	4,10E-03
LOC10560297	0,78	1,47E-03	COL4A5	-0,61	4,95E-03
LOC10699041	1,16	1,47E-03	PARP3	-1,30	5,35E-03
Lehen 10 DAGak Txerto eta Kontrol taldeen arteko konparazioan					
SELENOK	0,71	3,53E-06	FAM181A	-1,11	4,81E-03
LOC10112096	0,86	2,53E-03	JUN	-0,63	4,81E-03
DEPP1	0,98	4,81E-03	LOC101122601	-5,69	4,81E-03
E2F2	0,76	4,81E-03	LOC121818087	-1,11	4,81E-03
LOC10110377	1,70	4,81E-03	NTSR1	-1,24	4,81E-03
LOC10699041	1,20	4,81E-03	LOC114117120	-1,97	7,32E-03
CRELD2	0,63	5,06E-03	LOC121816775	-1,27	1,44E-02
LOC10560281	0,89	5,10E-03	MYO6	-0,81	1,50E-02
S100A9	1,41	9,46E-03	LOC121817866	-1,10	1,61E-02
LOC10111479	1,07	9,92E-03	LOC121817744	-1,14	1,72E-02

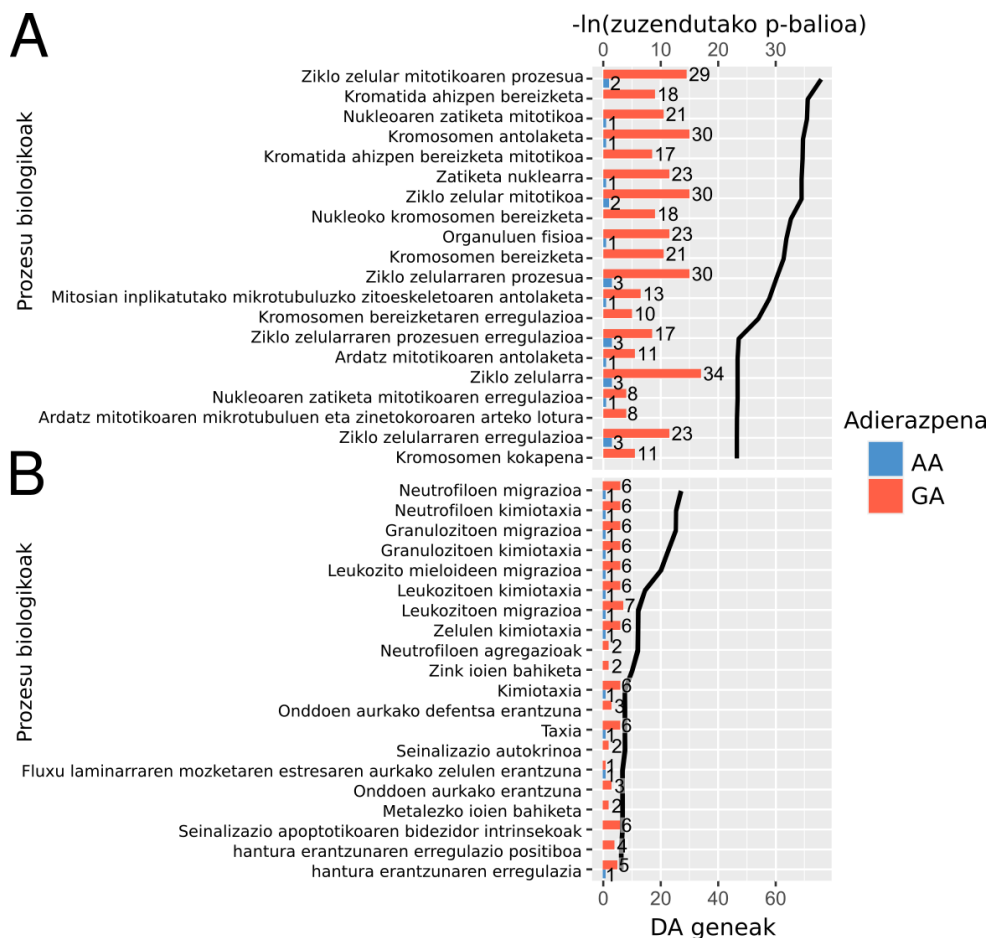
3.3 Aberasturiko prozesu biologikoak

Geneak funtzio, prozesu eta bidezidor desberdinekin erlazionatuta daude. Diferentzialki adierazitako gene talde batean funtzio jakin bat gene ugarirekin lotuta badago, funtzio hori aberastuta dagoela esaten da. Funtzio aberastuek aztertutako laginean gertatzen ari denari buruzko informazio biologiko ugari ematen digute. Aberastasun analisia egiteko gProfiler2 izeneko programa erabili zen eta Gene Ontology (GO) datu baseko prozesu biologikoak erabili ziren. TvsA konparazioan aberastutako 179 prozesu biologiko aurkitu ziren. Prozesu esangarrienen artean ziklo zelularrekin loturiko terminoak aurkitu ziren, hala nola, Kromosomen antolaketa, zatiketa nuklearra, ziklo zelularra edo ziklo zelular mitotikoa (3A irudia). Ziklo zelularrekin erlazionatutako prozesuen agerpena lotuta egon daiteke erantzun immunitario moldagarrian gertatzen den linfozitoen areagotzearekin, hau da, espantsio klonalarekin (Delves eta Roitt, 2000).

EE-ren estresarekin loturiko terminoak ere topatu genituen TvsA konparazioan. Horien artean aipa ditzakegu erretikulu endoplasmaticoaren estresaren aurkako erantzuna, topologikoki akatsdunak diren proteinen aurkako erantzuna edo tolestu gabeko proteinen aurkako erantzuna. EE-ren estresaren aurkako erantzunak oso garrantzitsuak dira erantzun immunitarioa gertatzean, antigorputzen etengabeko sintesiak eta sekrezioak eragindako estresa txikiagotu eta EE-ren homeostasia berrezartzeko (Adolph et al., 2012; Hetz et al., 2018; Todd et al., 2008). Erantzun immunitarioarekin loturiko prozesu aberastuak ere detektatu ziren TvsA konparazioan.

TvsK konparazioan soilik 20 aberastutako prozesu biologiko topatu ziren (3B irudia). Prozesu esangarrienen artean erantzun immunitarioarekin loturiko prozesuak topatu ziren, bereziki neutrofilo eta granulozitoen migrazio eta kimiotaxiarekin erlazionatuak. 7 DAG berdinak daude inplikaturako prozesu horietan: EDN3, LGALS3, TNFAIP6, TREM1, S100A12, S100A8 eta S100A9. TvsA eta TvsK konparazioetan lorturiko gene eta prozesuak, beste ikerketa batzuetan etxe-abereen baren infekzio bat gertatu ostean detektaturiko gene eta prozesuekin bat datoz (Hu et al., 2022; Li et al., 2010; Matulova et al., 2012; Van Goor et al., 2017)

3. irudia. Txerto eta AH taldeen arteko konparazioan (A) eta Txerto eta Kontrol arteko konparazioan (B) lorturiko DAGekin eginiko aberastasun analisia. Irudian zuzendutako p-balioa txikiena duten lehen 20 terminoak agertzen dira. Aberastasun analisia Gene Ontology datu baseko Prozesu biologikoei egin zen. Urdinez termino bakoitzean azpiadierazitako (AA) gene kopurua azaltzen da eta gorritz gainadierazitako (GA) gene kopurua (Guisasola-Serrano et al.-etik moldatua, 2024).



4. Ondorioak

Lan honetan AH txerto-laguntzailearen txertoekin eta AH bakarrekin egindako txertaketa errepikakorren ondoren ardiaren baren emandako transkriptomaren aldaketa aztertu da. Tratamendu guztiak binaka konparatuz detektaturako diferentzialki adierazitako geneez eta gene horietan aberastutako prozesuez baliatu gara transkriptoma aztertzeko. Hasteko, TvsK eta TvsA konparazioetan lorturiko geneen antzekotasuna, PCAn ikusitako AH eta Kontrol laginen gainjartzea eta AvsK erkaketan detektaturiko gene urriek adierazten dute txertoa bere osotasunean egon behar dela (osagai antigenikoaren presentzia beharrezkoa dela) baren erantzun transkriptomiko indartsuago bat eragiteko. Gainera, TvsK eta TvsA konparazioetan lorturiko emaitzek adierazten dute, AH txerto-laguntzailea duen txerto bat jaso ostean, baren EE-re estresarekin, erantzun immunitarioarekin eta ziklo zelularrarekin loturiko geneak eta prozesuak pizten direla.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira, bareako transkriptoma osoa aztertu ahal izateko, bestelako RNA ez-kodetzaileak aztertu ahalko genituzke, hala nola RNA zirkularrak. Era honetan aluminiodun txerto-laguntzaileak genen erregulazioan bestelako eraginik duten aztertu ahal izango da. Baita ere, RNA txikien sekuentziazioaz baliatuta, bestelako transkripto txikiagoak karakterizatu eta aztertu ahalko genituzke. Gainera, esperimentuko ardietatik erauzi ziren eta oraindik ikertu ez ditugun ehunak azter ditzakegu, nodulu linfatiko preeskapularra edo bizkarrezur-muin lunbarra, adibidez.

6. Erreferentziak

- Adolph, T. E., Niederreiter, L., Blumberg, R. S. eta Kaser, A. (2012). Endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Digestive Diseases*, 30, 341-6. <https://doi.org/10.1159/000338121>
- Asín, J., Molín, J., Pérez, M., Pinczowski, P., Gimeno, M., Navascués, N., ... Luján, L. (2019). Granulomas following subcutaneous injection with aluminum adjuvant-containing products in sheep. *Veterinary Pathology*, 56, 418–28. <https://doi.org/10.1177/0300985818809142>
- Bilbao-Arribas, M., Varela-Martínez, E., Abendaño, N., de Andrés, D., Luján, L. eta Jugo, B. (2021). Identification of sheep lncRNAs related to the immune response to vaccines and aluminium adjuvants. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08086-z>
- Danielsson, R. eta Eriksson, H., (2021). Aluminium adjuvants in vaccines – A way to modulate the immune response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 115, 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.12.008>
- Delves, P. J. eta Roitt, I. M. (2000). The immune system. *The New England Journal of Medicine*, 343, 37-49. <https://doi.org/10.1056/nejm200007063430107>
- Ghimire, T. (2015). The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. *SpringerPlus*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0972-0>
- Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H. eta Wallace, U. (1926). Immunological notes. XVII-XXIV. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29, 31-40. <https://doi.org/10.1002/path.1700290106>
- Guisasola-Serrano, A., Bilbao-Arribas, M., Varela-Martínez, E., Abendaño, N., Pérez, M., Luján L. eta Jugo, B. M. (2024). Identifying transcriptomic profiles in ovine spleen after repetitive vaccination. *Frontiers in Immunology*, 15, 1664-3224. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1386590>
- He, P., Zou, Y. eta Hu, Z. (2015). Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(2), 477-488, <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>
- Hetz, C., eta Papa, F. R. (2018). The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular Cell*, 69, 169-81. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>
- Hu, R. S., Zhang, F. K., Ma, Q. N., Ehsan, M., Zhao, Q. eta Zhu, X. Q. (2022). Transcriptomic landscape of hepatic lymph nodes, peripheral blood lymphocytes and spleen of swamp buffaloes infected with the tropical liver fluke *Fasciola gigantica*. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 16:e0010286. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010286>
- Li, R., Zhang, A., Chen, B., Teng, L., Wang, Y., Chen, H. eta Jin, M. (2010). Response of swine spleen to *Streptococcus suis* infection revealed by transcription analysis. *BMC Genomics*, 11(556). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-556>
- Luján, L., Pérez, M., Salazar, E., Álvarez, N., Gimeno, M., Pinczowski, ... Chapullé, J. L. (2013). Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (Asia syndrome) in commercial sheep. *Immunologic Research*, 56(2-3), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8404-0>
- Matulova, M., Rajova, J., Vlasatikova, L., Volf, J., Stepanova, H., Havlickova, H., ... Rychlik, I. (2012). Characterization of chicken spleen transcriptome after infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *PloS One*, 7:e48101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048101>
- Nicholson, L. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275-301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>
- O'Hagan, D., MacKichan, M. eta Singh, M. (2001). Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomolecular Engineering*, 18(3), 69-85. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00101-0)
- Petrovsky, N. eta Aguilar, J., (2004). Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology & Cell Biology*, 82(5), 488-496. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01272.x>

- Pitt, S.J. eta Gunn, A. (2024). The One Health Concept. *British Journal of Biomedical Science*, 81(12366). <https://doi.org/10.3389/bjbs.2024.12366>
- Reed, S. G., Orr, M. T., eta Fox, C. B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 19(12), 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>
- Todd, D. J., Lee, A. H., eta Glimcher, L. H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 8, 663-74. <https://doi.org/10.1038/nri2359>
- Tomley, F. eta Shirley, M. (2009). Livestock infectious diseases and zoonoses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1530), 2637-2642. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0133>
- Van Goor, A., Ashwell, C. M., Persia, M. E., Rothschild, M. F., Schmidt, C. J. eta Lamont, S. J. (2017). Unique genetic responses revealed in RNA-seq of the spleen of chickens stimulated with lipopolysaccharide and short-term heat. *PloS One*, 12:e0171414. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171414>
- Varela-Martínez, E., Abendaño, N., Asín, J., Sistiaga-Poveda, M., Pérez, M. M., Reina, R., ... Jugo, B. M. (2018). Molecular signature of aluminum hydroxide adjuvant in ovine PBMCs by integrated mrna and microrna transcriptome sequencing. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02406>
- Varela-Martínez, E., Bilbao-Arribas, M., Abendaño, N., Asín, J., Pérez, M., De Andrés, ... Jugo, B. M. (2020). Whole transcriptome approach to evaluate the effect of aluminium hydroxide in ovine encephalon. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71905-y>

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau *Frontiers in Immunology* izeneko aldizkarian argitaratu zen pasaden urtean (Guisasola-Serrano et al., 2024). Egindako ikerketa UPV/EHUK (GIU20/17) eta Eusko Jaurlaritzak (IT1693-22) ikerketa taldeei eskainitako dirulaguntzen bidez eraman da aurrera. Gainera, A. Guisasola-Serranok eta M. Bilbao-Arribasek UPV/EHUKo doktorego aurreko kontratua izan dute (PIF 23/211; PIF 17/306), N. Abendañok UPV/EHUKo doktorego ondoko kontratua izan du (ESP-DOC16/43) eta E. Varela-Martínez-ek Europako Next Generation Funds-en bidezko finantziazioa izan du, lana burutu bitartean, Margarita Salas kontratu baten bidez (MARSA21/83). Azkenik, eskerrak eman nahi genuke CIBIREk (Centro de Investigación Biomédica de La Rioja) eta SGikerrek (UPV/EHUren Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorrak) eskainitako laguntza teknikoagatik eta giza laguntzagatik.