

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

UNIVERSITÉ DE POITIERS

Faculté de Médecine et Pharmacie



Tesis para la obtención del Grado Académico de

Doctor en Ciencias Biológicas

**“Análisis de nuevos vehículos y adyuvantes para
inmunización con antígenos de *Staphylococcus aureus*
utilizando diferentes modelos experimentales”**

Lic. Ivana Gabriela Reidel

Directora de Tesis: Dra. Carolina M. I. Veaute

Co-directora de Tesis: Dra. Cecilia M. Camussone

Director de Co-tutela: Dr. Jean-François Jégou

Laboratorio de Inmunología Experimental - FBCB - UNL

Estación Experimental Agropecuaria Rafaela - INTA

Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC) - UP

-2020-

AGRADECIMIENTOS

Si bien el doctorado culmina con ese profesional que finalmente accede a su título de Doctor, es el resultado de un largo camino que requiere del aporte colectivo de diversos actores. Hoy estoy transitando la última etapa de mi camino y quiero agradecer a todos aquellos que lo hicieron posible.

A nuestro país, Argentina, no sólo por haberme ofrecido una educación pública y gratuita desde mis 4 años, sino también por haberme brindado las herramientas necesarias para llevar adelante un posgrado. En particular, gracias a todos los ciudadanos argentinos porque sin sus aportes estas medidas públicas no serían posible.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por haberme otorgado las becas que permitieron que me dedique íntegramente a esta investigación y por los financiamientos recibidos para llevar adelante el proyecto.

Al MINCYT y al Ministère des Affaires Étrangères et du Développement International de la República Francesa por habernos seleccionado para ser partícipes del programa ECOS-Sud. Sin su confianza en nuestro proyecto, gran parte del desarrollo de esta tesis no hubiese sido posible.

A la Universidad Nacional de Litoral y, particularmente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), mi segunda casa, por haberme brindado todas las herramientas necesarias para el ejercicio de esta profesión que tanto amo. Gracias a los directivos, personal docente y no docente, porque son los verdaderos responsables del sin número de oportunidades que brinda esta institución a cada uno de sus alumnos.

A la Université de Poitiers (UP), no sólo por haberme aceptado como alumna sino también por haber financiado la extensión de mis estancias. Gracias por haber confiado en este proyecto, por haber permitido mi formación en co-tutela y, principalmente, por ofrecerme todas las herramientas de las que disponían para hacer de esta una experiencia que nunca olvidaré.

A los miembros de la Comisión de Doctorado de la FBCB y de la École Doctorale en Sciences Biologiques & Santé de la UP, por el esfuerzo conjunto realizado en pro de que este proyecto de tesis pueda ser llevado a cabo en co-tutela. Especialmente, gracias a la Dra. Gabriela Micheloud, por haber estado ahí cada vez que necesité su apoyo. Y, por su puesto, gracias a Yamila y Enrique por guiarme siempre que me perdía con los trámites y requisitos que debía cumplir.

A mi directora, la Dra. Carolina Veaute por absolutamente todas las oportunidades que me brindó en los últimos 9 años. Gracias Caro por haberme elegido aquella primera vez y por confiar en mí este proyecto. Gracias por las horas sentadas juntas pensando ensayos y las tantas otras analizando y discutiendo resultados para volver a pensar más ensayos, por corregir cada informe, manuscrito, o lo que sea, siempre con gran dedicación y buscando que yo pueda aprender algo en cada etapa. Gracias por enseñarme a hacer ciencia.

A mi co-directora, la Dra. Cecilia Camussone por haber estado a mi lado siempre. Gracias Ceci por tu dedicación y tu ayuda cuando yo no podía estar ahí al 100%. Pero, sobre todo, gracias por tu compañía en cada uno de los ensayos que hicimos juntas, te confieso que no me importa como hayan salido ni cuantos miles de horas hayamos viajado, me importa que estuviste ahí para apoyarme sin importar el resultado.

A mi director de co-tutela, el Dr. Jean-François Jégou por haberse sumado a este proyecto con sus conocimientos, ideas y energías. Gracias JF por todas esas horas de bioterio, por guiarme en todos esos ensayos nuevos y por estar siempre atento a lo que necesitara. Gracias también por

alentarme a conocer lugares nuevos y cuidarme los cultivos si me escapaba un par de días. Merci pour tout.

A mis compañeras y amigas del Lab. Gracias Inés por estar siempre disponible y preparada para brindar una mano cuando hace falta. Gracias Cris por contagiar siempre esa sonrisa que te caracteriza. Gracias Adri por brindarme siempre tu apoyo y permitir que me adueñe de tu laboratorio cada vez que lo necesitaba. Gracias Romi por tu compañía dentro y fuera del laboratorio. Gracias So y Maga por estar siempre ahí ofreciendo su tiempo y cariño. Gracias también a todos esos pasantes que aportaron su granito en este proyecto. Gracias Ceci porque el último tramo no hubiese sido completamente posible sin tu ayuda.

A los miembros del laboratorio de Sanidad Animal de INTA Rafaela que permitieron que mis ensayos sean posibles. En particular, gracias al Dr. Luis Calvino por apostar en mí con esa primera beca que me abrió tantas puertas. Gracias a Guille y Cacho por estar siempre dispuesto y con una sonrisa (felices de verme llegar con la conservadora) para salir al campo, abajo del sol, con frío o hasta lluvia. Sin su aporte ningún ensayo hubiese sido posible.

A mis colegas del LITEC porque desde el primer día me hicieron sentir un miembro más del laboratorio. Gracias a los Dres. Franck Morel y Jean-Claude Lecron por abrirme las puertas de su laboratorio y dejar a disposición todos los recursos que necesitara. Gracias a todos por estar ahí para orientarme con paciencia cada vez que estaba un poco perdida entre tantas cosas nuevas. Gracias Alexia porque desde el día 1 tuviste una sonrisa para mí y, a pesar de que nos costaba comunicarnos, siempre nos entendíamos.

A la Dra. Diana Müller por dejar siempre a disposición sus nuevos desarrollos para ser probados en nuestros ensayos, pero, sobre todo, por sus innumerables palabras de aliento.

A Isabelle Petit-Paris y todo el equipo de PREBIOS porque estar sumamente comprometidos con su trabajo y asegurar siempre las mejores condiciones para los animales.

Al Dr. Emile Béré y su equipo por aceptar el reto de fotografiar nuestras formulaciones. Gracias por sus esfuerzos y las imágenes obtenidas.

Al grupo de Fisicoquímica de la Facultad de Ingeniería Química-INCAPE por dejar a disposición el equipo para la realización de la técnica de DLS. Gracias Anto por haber acomodado tus tiempos cada vez que necesitaba analizar una muestra y haberme recibido con tanta alegría.

A la Dra. Patricia Zamorano y su equipo por recibirnos en su laboratorio y brindarnos su ayuda desinteresada cuando la necesitamos. En particular, gracias a la Dra. Ivana Soria por habernos brindado su tiempo y asesoramiento.

A todos esos colegas que han estado predispuestos a brindar una mano cuando la necesité.

A mis compañeros de la cátedra de Inmunología Básica por los momentos compartidos y el trabajo en equipo. Gracias a la Dra. Marina Etcheverrigaray por darme la posibilidad de explotar mi vocación docente enseñando lo que más disfruto.

A los miembros del Comité de Ética de la FBCB, por haberme hecho parte de esa mesa de trabajo de la que me llevo muchos aprendizajes.

A todas esas personas que me hicieron sentir como en casa aún cuando estaba a miles de kilómetros de mi hogar. Gracias Adriana, mi colega argentina del otro lado del charco, por toda tu paciencia y ayuda en el laboratorio y, principalmente, por tu compañía. Gracias a Vincent, Lucas y Clara, por haberme aceptado con alegría cada vez que Adri me sumaba a sus planes. A Mathilde por hacerse siempre un tiempo para encontrarnos y pasar unos días juntas. A Irene,

Pietro y Carlos por todas esas experiencias multiculturales en las que me incluyeron como si me conocieran de toda una vida.

A mis amigos de la vida por estar siempre ahí para un brindis, un consuelo, una palabra de aliento, un abrazo, para lo que sea. Gracias Pau, Nare, Iva y Rodri por estar ahí para escuchar siempre mis historias de tesis. Gracias Santi, Agos, Maira y a los Marces por estar siempre presentes y tener siempre lista la excusa para las juntas tan necesarias. Gracias Chechu y Nacho por alentar siempre nuestros proyectos y hacernos parte de los suyos. Gracias Flora porque no importa cuánto tiempo pase, siempre estás lista para volvernos a encontrar.

A mi familia, que amo tanto, por estar presentes en mi vida desde que nací. A mis padres por confiar y enseñarme a confiar en mis decisiones, por haberme apoyado siempre y permitido perseguir mis sueños, aunque impliquen volar lejos. A mis hermanas, mis compañeras de la vida entera, por cuidarme siempre como si fueran mis hermanas mayores, por fumarse las mil catarsis y crisis existenciales, por ser muchas veces mi cable a tierra. A mis tías y mi prima Valeria por alentarme y desearme siempre lo mejor en cada nueva etapa. A mis abuelos por estar siempre conmigo. A mi abuelo por alegrarse cada vez que me veía llegar y brindarme esa sonrisa campechana. A mi abuela que me repetía, “¿hasta cuándo vas a estudiar nena?” y celebraba mis logros, aunque no entendiera muy bien de que iba esto de un doctorado. A mi nono por ser la razón de mi vocación y haber estado en cada presentación a la que pudiera asistir sin importar cuán cansado estuviera. A mi nona, que tengo la suerte de tenerla aún conmigo, por estar siempre pendiente de como me va en cada cosa nueva que emprendo.

A la familia de José por haberme adoptado como hija, sobrina o nieta. Gracias a Silvia, Dani y Germán por estar presentes y brindarnos siempre su ayuda cuando la necesitamos. Gracias Nely por estar atenta y acercarnos, cada vez que puede, algo de comer para que no perdamos tiempo cocinando (Gracias, aunque ya sabe que no es necesario). Gracias Pety por llamar siempre para chequear como estamos y tenernos en sus oraciones. Gracias a todos por su apoyo y compañía.

A mi amado José por tu apoyo incondicional y por nunca dejar que me rinda. Gracias por cuidarme, por tus besos y abrazos, por hacerme sonreír cada día desde que te conocí, por estar a mi lado incluso en la distancia. Gracias por ser mi mayor compañero en esta larga aventura que llamamos vida. Te amo.

Gracias a todos por haber sido parte de este camino. Pronto me tocará comenzar a transitar uno nuevo y aún incierto, pero del que estoy segura que también formarán parte porque guardo dentro de mí las enseñanzas que cada uno de ustedes me han dejado.

Dragonfly out in the sun you know what I mean, don't you know.

Butterflies all havin' fun you know what I mean.

Sleep in peace when day is done,

that's what I mean.

And this old world is a new world

and a bold world

for me.

(...) And I'm feeling good.

Nina Simone, Feeling good.

PUBLICACIONES

1. LD Grippo, IG Reidel, MI García, A Streu, DM Müller, CM Veaute (2020) Gemini lipopeptides as vaccine adjuvants: a new role for these versatile carriers. *Clin Exp Vaccine Res*, 9:1-5
2. IG Reidel, C Camussone, GA Suarez Archilla, LF Calvinho, C Veaute (2019) Liposomal and CpG-ODN formulation elicits strong humoral immune responses to recombinant *Staphylococcus aureus* antigens in heifer calves. *Vet Immunol Immunopathol*, 212:1-8.
3. IG Reidel, MI García, V González, A Giorello, LF Calvinho, A Gennaro, C Veaute (2017) Effects of the liposomal co-encapsulation of antigen and PO-CpG oligonucleotide on immune response in mice. *International Journal for Research in Applied and Natural Science*, Vol. 3(6): 1.

AGRADECIMIENTOS	I
PUBLICACIONES	IV
ÍNDICE.....	V
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	8
RÉSUMÉ	12
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	16
<i>Staphylococcus aureus, una bacteria comensal y patógena</i>	<i>16</i>
<i>Prevención y tratamiento de la infección.....</i>	<i>16</i>
<i>Factores de virulencia de S. aureus y evasión del sistema inmune</i>	<i>17</i>
<i>La vacunación como una herramienta para la prevención</i>	<i>22</i>
<i>La necesidad de un adyuvante.....</i>	<i>24</i>
<i>Los liposomas como adyuvante</i>	<i>27</i>
OBJETIVOS	32
CAPÍTULO 1.....	33
INTRODUCCIÓN	34
<i>Mastitis bovina de etiología infecciosa y sus efectos sobre la ubre.....</i>	<i>34</i>
<i>Efectos de la mastitis bovina en la rentabilidad del tambo</i>	<i>37</i>
<i>Prevención y tratamiento de los casos de mastitis</i>	<i>37</i>
<i>Vacunas disponibles y su capacidad protectora</i>	<i>39</i>
<i>Las vacunas a subunidades como opción para mejorar la capacidad protectora</i>	<i>42</i>
<i>La importancia del calendario de vacunación.....</i>	<i>43</i>
OBJETIVOS	46
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Diseñar y evaluar un esquema de inmunización hacia S. aureus en terneras	47
1.1.1. <i>Composición del inmunógeno experimental</i>	<i>47</i>
1.1.2. <i>Formulación de los inmunógenos experimentales</i>	<i>47</i>
1.2.1. <i>Animales experimentales y cronograma de vacunación</i>	<i>47</i>
1.2.2. <i>Procedimientos de muestreo.....</i>	<i>48</i>
1.3.1. <i>Determinación de anticuerpos específicos</i>	<i>48</i>
1.3.2. <i>Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos.....</i>	<i>49</i>
i. <i>Purificación de anticuerpos específicos</i>	<i>49</i>
ii. <i>Ensayo de bloqueo</i>	<i>49</i>

2. Evaluar un esquema de inmunización en vaquillonas y vacas preñadas, utilizando la formulación seleccionada con base en los resultados previos	49
2.1.1. Composición del inmunógeno experimental	50
2.1.2. Formulación del inmunógeno experimental	50
2.2.1. Animales experimentales y cronograma de vacunación	50
2.2.2. Procedimientos de muestreo	50
2.3.1. Determinación de anticuerpos específicos	51
2.3.2. Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos	51
i. Obtención de α -toxina y β -toxina nativa de <i>S. aureus</i>	51
ii. Inhibición de actividad hemolítica	51
Tratamiento estadístico	52
Consideraciones éticas	52
RESULTADOS	53
1. Diseñar y evaluar un esquema de inmunización hacia <i>S. aureus</i> en terneras	53
1.1. Respuesta humoral generada por el esquema de 4 dosis	53
1.1.1. Niveles de IgG anti-rFnBPA y anti-rClfA en suero	53
1.1.2. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA y anti-rClfA en suero	54
1.2. Respuesta humoral generada a partir del refuerzo pre-parto	55
1.2.1. Niveles de IgG anti-rFnBPA y anti-rClfA en suero	56
1.2.2. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA y anti-rClfA en suero	56
1.2.3. Niveles de IgG anti-rFnBPA y anti-rClfA en leche	57
1.2.4. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA y anti-rClfA en leche	57
1.3. Funcionalidad de los anticuerpos	58
1.3.1. Capacidad de bloqueo	58
2. Evaluar un esquema de inmunización en vaquillonas y vacas preñadas, utilizando la formulación seleccionada con base en los resultados previos	59
2.1. Respuesta humoral generada por el esquema de 2 dosis al pre-parto	59
2.1.1. Niveles de IgG anti-rFnBPA, anti-rClfA, anti-r α -toxina y anti-r β -toxina en suero	59
2.1.2. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA, anti-rClfA, anti-r α -toxina y anti-r β -toxina en suero	61
2.1.3. Niveles de IgG anti-rFnBPA, anti-rClfA, anti-r α -toxina y anti-r β -toxina en leche	61
2.1.4. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA, anti-rClfA, anti-r α -toxina y anti-r β -toxina en leche	63
2.2. Funcionalidad de los anticuerpos	63
2.2.1. Inhibición de la actividad hemolítica	63
DISCUSIÓN	66
De la respuesta inmune generada en terneras	66
De la respuesta inmune generada en vaquillonas y vacas preñadas	70
CONCLUSIONES	74
CAPÍTULO 2	76
INTRODUCCIÓN	77
El rol de los inmunoestimulantes en el surgimiento de la nueva generación de adyuvantes	77

ODN-CpG, un inmunoestimulantes capaz de inducir una respuesta Th1.....	78
El receptor de manosa como target de un inmunoestimulante.....	80
Surfactantes aminoacídicos de tipo gemini, ¿una nueva generación de inmunoestimulantes?	81
La vía de administración, otro factor responsable de la respuesta inmune inducida por una vacuna. 83	
OBJETIVOS	85
MATERIALES Y MÉTODOS	86
3. Obtener diversas formulaciones liposomales complementadas con: ODN-CpG, O-palmitoil manano y/o SAA de tipo Gemini	86
3.1.1. Obtención de liposomas	86
3.1.2. Obtención del OPM	86
3.1.3. Obtención de SAA de tipo Gemini.....	87
3.1.4. Armado de liposomas con distintos inmunoestimulantes	87
3.2.1. Determinación de tamaños predominantes y potencial ζ (PZ)	87
3.2.2. Microscopia electrónica de transmisión (MET)	87
3.2.3. Microscopia electrónica de barrido (MEB)	87
3.2.4. Evaluación de la protección del ODN-CpG a la acción de ADNAsas.....	88
4. Evaluar, en un modelo murino, la utilización de las formulaciones obtenidas como adyuvante en vacunas a subunidades contra un antígeno de S. aureus	88
4.1.1. Composición del inmunógeno experimental	88
4.1.2. Formulación de los inmunógenos experimentales	88
4.2.1. Animales experimentales, cronograma de vacunación y procedimiento de muestreo	88
4.3.1. Determinación de anticuerpos específicos	90
4.3.2. Análisis de la respuesta celular local en ganglios drenantes.....	90
5. Evaluar la capacidad de las diferentes formulaciones como vehículo de vacunas a subunidades administradas de forma tópica.....	91
5.1.1. Obtención de epidermis murinas reconstituidas (EMR).....	91
5.1.2. Evaluación de la capacidad de transportar proteínas a través de EMR	91
5.2.1. Estimulación de queratinocitos	92
5.2.2. Estimulación de fibroblastos	92
5.2.3. Extracción de ARN y RT-PCR	93
Tratamiento estadístico	94
Consideraciones éticas.....	94
RESULTADOS.....	95
3. Obtener diversas formulaciones liposomales complementadas con: ODN-CpG, O-palmitoil manano y/o SAA de tipo Gemini	95
3.1. Caracterización de las partículas obtenidas	95
3.1.1. Tamaño y potencial ζ de las partículas obtenidos por DLS.....	95
3.1.2. Tamaño y forma de los liposomas obtenidos por microscopía	96
3.2. Efecto de las formulaciones liposomales en la acción de ADNAsas sobre el ODN-CpG	99

4. Evaluar, en un modelo murino, la utilización de las formulaciones obtenidas como adyuvante en vacunas a subunidades contra un antígeno de <i>S. aureus</i>	100
4.1. Respuesta inmune obtenida en ratones de la cepa BALB/c que recibieron 2 dosis	100
4.1.1. Niveles de IgG anti-rClfA en sueros obtenidos a lo largo del protocolo.....	100
4.1.2. Niveles de IgG1 e IgG2a anti-rClfA en sueros obtenidos luego de la segunda dosis.....	102
4.1.3. Niveles de IgG e IgA anti-rClfA en lavados vaginales a lo largo del protocolo	102
4.2. Respuesta inmune obtenida en ratones de la cepa BALB/c que recibieron 2 dosis y un refuerzo pre-sacrificio.....	103
4.2.1. Niveles de IgG anti-rClfA en sueros obtenidos al sacrificio.....	103
4.2.2. Niveles de IgG1 e IgG2a anti-rClfA en sueros obtenidos al sacrificio	104
4.2.3. Niveles de linfocitos T CD4+ y CD8+ en ganglios linfáticos.....	104
4.2.4. Niveles de linfocitos T CD4+ productores de IL-4, IL-17 e IFN- γ en ganglios linfáticos	105
4.2.5. Niveles de linfocitos T CD8+ productoras de IFN- γ en ganglios linfáticos	106
4.3. Respuesta inmune obtenida en ratones de la cepa C57BL/6J que recibieron 2 dosis y un refuerzo pre-sacrificio.....	106
4.3.1. Niveles de IgG anti-rClfA en sueros obtenidos al sacrificio.....	106
4.3.2. Niveles de IgG1 e IgG2c anti-rClfA en sueros obtenidos al sacrificio.....	107
4.3.3. Niveles de linfocitos T CD4+ y CD8+ en ganglios linfáticos.....	108
4.3.4. Niveles de linfocitos T CD4+ productores de IL-4, IL-17 e IFN- γ en ganglios linfáticos	109
4.3.5. Niveles de linfocitos T CD8+ productoras de IFN- γ e IL-17 en ganglios linfáticos.....	110
5. Evaluar la capacidad de las diferentes formulaciones como vehículo de vacunas a subunidades administradas de forma tópica	111
5.1. Capacidad de las formulaciones de transportar un colorante a través de EMRs	111
5.2. Capacidad de las formulaciones de activar queratinocitos y fibroblastos <i>in vitro</i>	112
5.2.1. Niveles de activación de genes codificantes para quemoquinas.....	112
5.2.2. Niveles de activación de genes codificantes para citoquinas.....	114
DISCUSIÓN	116
De la obtención y caracterización de las formulaciones liposomales	116
De la respuesta inmune generada en ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6J	118
De la capacidad de las formulaciones como adyuvante por vía transcutánea.....	124
CONCLUSIONES	129
CONCLUSIONES GENERALES	131
BIBLIOGRAFÍA	133

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Al(OH) ₃	Alhydrogel™ (Hidróxido de aluminio)
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BAC	<i>Buffer</i> acetato
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
Clf	<i>Clumping factor</i> (factor de agregación)
CLR	Receptor de lectina de tipo C
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
COMETHEA	<i>Comité d'Ethique en Expérimentation Animale</i>
CP	Polisacárido capsular
CRM ₁₉₇	Mutante no tóxica de la toxina diftérica de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> C7
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetil formamida
DNP	ADN bacteriano con secuencias CpG no metiladas
DO	Densidad óptica
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
EA	Estearilamina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMR	Epidermis murinas reconstituidas
FASS	<i>Federation of Animal Science Societies</i>
Fb	Fibrinógeno
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
Fn	Fibronectina
FnBP	Proteína de unión a fibronectina
GALT	Tejido linfoide asociado con el intestino
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GR	Glóbulos rojos
GUV	Vesícula unilaminar gigante
HA	Hemaglutinina
HK	<i>Housekeeping</i> (gen control)
HKGS	<i>Human Keratinocyte Growth Supplement</i>
Hla	Hemolisina A (α -toxina)
IDO1	Indoleamina 2,3-dioxigenasa 1
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina

ILAR	<i>Institute for Laboratory Animal Research</i>
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPD	Índice de polidispersidad
IsdB	Proteína de superficie reguladora de hierro B
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
Lip	Liposomas
LITEC	<i>Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines</i>
LPV	Leucocidina de Panton-Valentine
LUV	Vesícula unilaminar grande
LY	<i>Lucifer Yellow</i>
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MLV	Vesícula multilaminar
MntC	Lipoproteína transportadora de manganeso C
MPL	Monofosforil lípido A
MR	Receptor de manosa
MVV	Vesícula multivesicular
NA	Neuraminidasa
nFcR	Receptor neonatal de Fc
NLR	Receptor de tipo NOD
NMC	<i>National Mastitis Council</i>
NMDF	Fibroblastos dérmicos murinos normales
NMEK	Queratinocitos epidérmicos murinos normales
ODN-CpG	Oligodesoxinucleótido con motivos CpG
OLV	Vesícula oligolaminar
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	<i>Over night</i>
OPM	O-palmitoil manano
PAMP	Patrones moleculares asociados con patógenos
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PEI	Polietilenimina
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
Poli(I:C)	Ácido poliinosinico-policitidílico
Prebios	Plataforma de investigación experimental en biología y salud
PZ	Potencial ζ
QS-21	Quillaja saponaria-21
rClfA	<i>Clumping factor A</i> recombinante
RCS	Recuento de Células Somáticas
Rec	Recombinantes
rFnBPA	Proteína de unión a fibronectina A recombinante
RI	Rango intercuartil
RLR	Receptor de tipo RIG-I
RRP	Receptor de reconocimiento de patrones
Rs	Coefficiente de correlación de Spearman
SAA	Surfactante aminoacídico

SAAC	Complejo antigénico asociado a exopolisacárido
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
ST	<i>Shock</i> térmico
SUV	Vesícula unilaminar pequeña
Tc	T citotóxico
TCR	Receptor de células T
Th	T <i>helper</i>
TLC	Cromatografía de capa delgada
TLR	Receptor de tipo Toll
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	T regulador
TRX	Tiorredoxina
TSST	Toxina del síndrome de <i>shock</i> tóxico
TT	Toxoides tetánico
UFC	Unidades formadoras de colonias
UP	Université de Poitiers
UV	Ultravioleta
WT	<i>Wild type</i>

RESUMEN

Se estima que la bacteria *Staphylococcus aureus*, es la responsable del 20-25% de las infecciones intra-hospitalarias, produciendo complicaciones serias capaces de prolongar hasta tres veces los estadios de hospitalización y quintuplicando el riesgo de muerte en pacientes infectados. Por otra parte, la mastitis bovina es un claro ejemplo de los efectos de este patógeno en el ámbito veterinario. Hasta el momento, tanto en el ámbito de la medicina humana como veterinaria, el control de la propagación de este patógeno se basa, por un lado, en la prevención, donde el componente clave es la higiene y por otro, en las terapias antibióticas, aplicadas una vez detectada la infección. Sin embargo, *S. aureus* presenta una extraordinaria habilidad para desarrollar resistencia, por lo que el uso desmedido de antibióticos, ha dado lugar a un rápido desarrollo de cepas con diversas resistencias. Es por esto, que se necesitan nuevas herramientas para la prevención de las infecciones causadas por *S. aureus*.

Staphylococcus aureus fue incluido en la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos publicada por la OMS, lo que convierte al desarrollo de una vacuna contra esta bacteria en una prioridad mundial. Sin embargo, hasta la fecha, no existen vacunas aprobadas para su uso en humanos. En el ámbito veterinario, existen 2 vacunas comerciales para el control de la mastitis bovina causada por este patógeno, sin embargo, ninguna de estas resulta completamente eficaz en la prevención de nuevas infecciones. Esta falta de eficacia, estaría asociada a la presencia de múltiples factores de virulencia en *S. aureus*, que contribuirían a la patogénesis de la infección. Por esto, existe un acuerdo generalizado sobre la necesidad de combinar múltiples antígenos en vacunas, para generar una respuesta inmune capaz de bloquear etapas claves en la patogénesis estafilocócica. A su vez, algunos autores sugieren que para un control eficiente de las infecciones causadas por *S. aureus*, sería clave la inducción de una respuesta de tipo Th1/Th17.

El adyuvante utilizado en una vacuna es un factor crítico para su eficacia. La combinación apropiada de antígenos y adyuvantes, se vuelve clave para la formulación de vacunas eficaces contra *S. aureus*. Entre los adyuvantes de nueva generación se encuentran los liposomas, vesículas fosfolipídicas capaces de favorecer el desarrollo de respuestas inmunes específicas, mediante el transporte del antígeno junto con moléculas inmunoestimulantes. Nuestro grupo de trabajo diseñó un adyuvante basado en liposomas catiónicos, suplementado con oligonucleótidos con motivos CpG (ODN-CpG), como inmunoestimulante. Su evaluación en ratones BALB/c, utilizando un antígeno proteico modelo, resultó en la generación de altos títulos de anticuerpos, con producción de IgG1 e IgG2a, estimulación de linfocitos T con producción de IFN- γ y sin efectos adversos.

Frente a estos antecedentes, en la presente tesis se trabajó sobre un doble objetivo. Por un lado, se estudió la respuesta inmune generada en terneras, vaquillonas y vacas preñadas tras la

inmunización con una vacuna a subunidades, que incluyó distintos antígenos recombinantes de *S. aureus*, formulados con los adyuvantes liposomales previamente evaluados en ratón por nuestro grupo. Por otro lado, se generaron diversas formulaciones liposomales que contenían distintos inmunoestimulantes junto a un antígeno de superficie de *S. aureus* recombinante, factor de agregación (rClfA) y se estudió su capacidad de inducir una respuesta inmune eficiente en un modelo experimental murino. Asimismo, se evaluó la capacidad de las distintas formulaciones liposomales como vehículo y adyuvante en la administración transdérmica e intradérmica de vacunas.

En el primer capítulo se presentan los resultados obtenidos en bovinos tras la inmunización con una vacuna prototípica a subunidades contra *S. aureus*. En una primera instancia, se inmunizaron terneras de 6 a 8 meses de edad con 3 dosis de un inmunógeno que contenía los antígenos recombinantes de *S. aureus*, proteína de unión a fibronectina (rFnBPA) y rClfA. Un año más tarde recibieron una cuarta dosis y 21 días previos al primer parto un refuerzo. El inmunógeno se formuló alternativamente con liposomas (Lip), ODN-CpG, liposomas con ODN-CpG (Lip+ODN-CpG), o hidróxido de aluminio (Al(OH)₃). Se evaluó la respuesta humoral inducida, en sangre durante todo el protocolo y en leche, al comienzo de la lactancia. Luego de las primeras 3 dosis, los grupos Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA e Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA, alcanzaron los mayores niveles de IgG en sangre. Luego de la cuarta dosis, ambas formulaciones generaron un aumento rápido en los niveles de IgG en sangre, manteniéndose elevados incluso hasta el día 60 post refuerzo. Una respuesta semejante en los niveles de IgG, fue observada luego del refuerzo pre-parto. La producción de IgG1 en sangre estuvo estimulada en todos los grupos experimentales, mientras que sólo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA indujo la producción de IgG2 específica. En las muestras de leche, se encontraron niveles aumentados de IgG específicas en todos los grupos experimentales, caracterizada por la presencia de IgG1 y ausencia de IgG2. Asimismo, se demostró que, luego del refuerzo pre-parto, los anticuerpos generados en los grupos Lip+rFnBPA/rClfA y Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA podrían disminuir la unión de *S. aureus* a fibrinógeno. Estos resultados permitieron concluir que la inmunización con proteínas recombinantes formuladas con un adyuvante basado en liposomas catiónicos y un ODN-CpG, es un método viable para la inducción de una fuerte respuesta inmune humoral, con producción de IgG2 específica y generación de una respuesta inmune de memoria. Esto permitió seleccionar este adyuvante para su evaluación en un plan de inmunización aplicado en la etapa tardía de gestación.

En esta segunda instancia, se inmunizaron vaquillonas y vacas preñadas, en el último trimestre de gestación, las cuales fueron divididas al azar en dos grupos. El grupo tratado fue inmunizado con la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, que contuvo como inmunógeno los antígenos recombinantes de *S. aureus*, rFnBPA, rClfA, r α -toxina y r β -toxina, mientras que el grupo restante actuó como control sin inmunizar. El grupo tratado recibió 2 dosis previas al parto. Se evaluó la respuesta humoral inducida, en sangre durante todo el protocolo y en muestra de

leche, hasta 1 mes post parto. La administración de la formulación Lip+ODN-CpG+Rec resultó en un aumento en los niveles de IgG específica, en sangre, contra los 4 antígenos evaluados, con producción de IgG1 e IgG2, y predominancia del primer subtipo. En este grupo, los niveles de IgG específicos en leche tendieron a ser más elevados al momento del parto. Finalmente, se demostró que los anticuerpos inducidos por la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, serían capaces de inhibir la actividad hemolítica de la α -toxina y β -toxina nativa de *S. aureus*.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que es posible inducir una respuesta inmune humoral específica en bovinos, a partir de la administración de una vacuna a subunidades, utilizando como adyuvante, liposomas catiónicos suplementados con un ODN-CpG. Asimismo, permiten sugerir la implementación de planes de vacunación que comiencen a temprana edad, como una herramienta que podría mejorar la eficacia de una nueva vacuna.

En el segundo capítulo se obtuvieron una serie de formulaciones compuestas por liposomas cargados con distintos inmunoestimulantes; un ODN-CpG, un surfactante aminoacídico de tipo *gemini* (AG2-C16) y un oligosacárido hidrofobizado, O-palmitoilmanano (OPM), así como la combinación del ODN-CpG con AG2-C16 u OPM, alternativamente. Las formulaciones obtenidas fueron caracterizadas, demostrándose que el agregado de los distintos inmunoestimulantes no generó cambios en la morfología de los liposomas, manteniéndose la conformación esférica, con tamaños comprendidos entre 150-450 nm. Asimismo, se observó que el ODN-CpG disminuye la estabilidad de los liposomas, siendo este efecto contrarrestado con el agregado de AG2-C16 u OPM en la formulación. A su vez, se demostró que los liposomas protegen al oligonucleótido de la acción de ADNasas, permitiendo utilizar un ODN-CpG con enlaces naturales, biocompatibles y de bajo costo como inmunoestimulante.

Posteriormente, se estudió la capacidad adyuvante de las distintas formulaciones en un modelo experimental murino. En primer lugar, se estudió la respuesta inducida al inmunizar ratones hembra de la cepa BALB/c, con el antígeno libre (rClfA), así como incorporado en tres formulaciones liposomales; Lip+ODN-CpG+rClfA; Lip+AG2-C16+rClfA y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA. Este estudio contó con dos ensayos independientes. En el primero se estudió la cinética de la respuesta inmune humoral, en sangre y mucosa vaginal, a lo largo de un protocolo de 2 dosis distanciadas tres semanas y hasta pasadas 3 semanas de la última dosis. En el segundo estudio se evaluó la respuesta celular inducida por las formulaciones, luego de aplicado un refuerzo pre-sacrificio 10 días post segunda dosis. Las células de los ganglios linfáticos, obtenidos al sacrificio, se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la producción de IL-4, IL-17 e IFN- γ en los linfocitos T CD4+ y CD8+. Este último ensayo fue repetido utilizando ratones hembra de la cepa C57BL/6J e incorporando las formulaciones: Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA. Los tres inmunoestimulantes probados, ODN-CpG, AG2-C16 y OPM, al ser formulados en liposomas fueron capaces de estimular una respuesta inmune humoral, en sangre, caracterizada por altos títulos de IgG específicas, con altos niveles de los subtipos,

IgG1 e IgG2a o IgG2c, en BALB/c o C57BL/6J, respectivamente. Las formulaciones liposomales evaluadas generaron un aumento en los niveles de IgG en lavado vaginal, con ausencia de IgA específica. Respecto a la respuesta celular, la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA, fue capaz de inducir los tres perfiles celulares evaluados Th1, Th2 y Th17, y de linfocitos Tc productores de IFN- γ . Considerando que esta respuesta coincide con el perfil deseado para el control de las infecciones causadas por *S. aureus*, los resultados obtenidos en este capítulo, permiten sugerir al adyuvante Lip+AG2-C16+ODN-CpG como un potencial candidato para posteriores ensayos en bovinos. Asimismo, el incremento de los niveles de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ , inducido por esta formulación, permiten proponer este adyuvante como una alternativa en el diseño de vacunas para la prevención de infecciones virales o cáncer.

Por último, en el segundo capítulo, se estudió la potencialidad de las distintas formulaciones en la inmunización por vía transdérmica. Para esto, por un lado, se evaluó la capacidad de las distintas formulaciones para transportar el colorante fluorescente Lucifer Yellow (LY), a través de una epidermis reconstituida de ratón (EMR). En este ensayo se observó que la incorporación de AG2-C16 a la formulación liposomal incrementó el pasaje del colorante a través de la EMR. Esto permite considerar a la formulación Lip+AG2-C16 como un sistema de *delivery* para la administración tópica de principios activos. Por otro lado, se estudió la capacidad de las distintas formulaciones, y sus componentes individuales, de estimular la activación de queratinocitos y fibroblastos *in vitro*. Se encontró que las formulaciones que contenían OPM como inmunoestimulante fueron capaces de estimular la expresión de quemoquinas y citoquinas proinflamatorias en fibroblastos. Entre ellas, se detectaron elevados los niveles de quimioattractantes de linfocitos Th1, Th17 y Tc, así como de neutrófilos, células requeridas para un control efectivo de *S. aureus* en el sitio de infección. Las formulaciones evaluadas no fueron efectivas en la activación de queratinocitos. Estos resultados permiten sugerir el uso de formulaciones que contengan OPM en modelos de inmunización mediante microinyección o por vía intradérmica. Asimismo, podría considerarse, en ensayos futuros, la utilización de una formulación que incluya tanto a OPM como a AG2-C16, para su aplicación en modelos de inmunización por vía transcutánea.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que los liposomas catiónicos constituyen un sistema adyuvante de gran versatilidad, que permiten la selección de los inmunoestimulantes a incluir, en función de las características de la respuesta inmune necesaria.

ABSTRACT

It is estimated that *Staphylococcus aureus* is responsible for 20-25% of nosocomial infections, leading to serious complications that may prolong hospitalization up to three times and quintuple the risk of death in infected patients. In addition, bovine mastitis is a clear example of the effects of this pathogen in the veterinary field. Until now, both in human and veterinary medicine, the control of this pathogen dissemination is based on prevention, where the key component is hygiene, and on antibiotic therapies, once the infection is detected. However, *S. aureus* has an extraordinary ability to develop resistance, and the excessive use of antibiotics has led to a rapid development of strains with antimicrobial resistance. Therefore, new tools are needed to prevent infections caused by *S. aureus*.

Staphylococcus aureus was included in the global priority list of antibiotic-resistant bacteria published by the WHO, making the development of a vaccine against it, a prime concern. However, to date, there are no vaccines approved for use in humans. In the veterinary field, there are 2 commercial vaccines for the control of bovine mastitis caused by this pathogen, but none of these is completely effective in preventing new infections. This lack of efficacy could be associated with the presence of multiple virulence factors in *S. aureus*, which contribute to the pathogenesis of the infection. Consequently, there is general agreement on the need to combine multiple antigens in vaccines, to generate an immune response able to block key stages in staphylococcal pathogenesis. Additionally, some authors suggest that the key for an efficient control of *S. aureus* infections, is the induction of a Th1/Th17 immune response.

The adjuvant used in a vaccine is a critical factor for its effectiveness. The appropriate combination of antigens and adjuvants becomes crucial to formulate an effective vaccine against *S. aureus*. One of the new generation adjuvants are liposomes, phospholipid vesicles able to promote the development of specific immune responses, by transporting the antigen together with immunostimulant molecules. Our group designed a cationic liposome-based adjuvant, supplemented with CpG motifs oligonucleotides (ODN-CpG), as immunostimulant. Its evaluation in BALB/c mice, using a model protein antigen, resulted in high antibody titers generation, with IgG1 and IgG2a production, stimulation of T lymphocytes with IFN- γ production and no adverse effects.

Considering this background, we work on two main objectives. Firstly, the induced immune response was studied in calves, heifers and pregnant cows after immunization with a subunit vaccine, which included different recombinant *S. aureus* antigens, formulated with the liposomal adjuvants previously evaluated in mice by our group. Secondly, various liposomal formulations containing different immunostimulants were generated, in combination with the recombinant *S. aureus* surface antigen, clumping factor (rClfA). Then, their ability to induce an

efficient immune response in a murine experimental model was studied. Moreover, the liposomal formulations capacity as carrier and adjuvant in transdermal and intradermal vaccine administration was evaluated.

In the first chapter, the results obtained in cattle after immunization with a prototypic subunit vaccine against *S. aureus* are presented. In a first assay, heifer calves of 6-8 months old were immunized with 3 doses of an immunogen containing the recombinant *S. aureus* antigens, fibronectin-binding protein (rFnBPA) and rClfA. A fourth dose was administered one year later and a single booster 21 days before the first calving. The immunogen was alternatively formulated with liposomes (Lip), ODN-CpG, liposomes with ODN-CpG (Lip+ODN-CpG), or aluminum hydroxide (Al(OH)₃). The humoral response was evaluated in blood throughout the protocol and in milk, at the beginning of lactation. After the first 3 doses, the Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA and Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA groups reached the highest levels of IgG in blood. After the fourth dose, both formulations generated a rapid increase in blood IgG levels, remaining elevated after 60 days post booster. A similar IgG response was observed after pre-calving booster. Blood IgG1 production was stimulated in all experimental groups, but only Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA induced specific IgG2 production. In milk samples, increased levels of specific IgG were found in all experimental groups, characterized by presence of IgG1 and absence of IgG2. It was also demonstrated that, after pre-calving booster, the antibodies generated in the Lip+rFnBPA/rClfA and Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA groups could decrease the *S. aureus* binding to fibrinogen. These results allow to conclude that immunization with recombinant proteins formulated with a cationic liposomes adjuvant and ODN-CpG, is a viable method to generate a strong humoral immune response, with specific IgG2 production and immune memory induction. So, we selected this adjuvant for its evaluation in a late stage gestation immunization plan.

In this second assay, pregnant heifers and cows were immunized in the last trimester of gestation. Animals were randomly divided into two groups. The treated group was immunized with Lip+ODN-CpG+Rec formulation, containing the recombinant *S. aureus* antigens, rFnBPA, rClfA, r α -toxin and r β -toxin as immunogens. The remaining group acted as an unimmunized control. The treated group received 2 doses before calving. The humoral response was evaluated in blood throughout the protocol and in milk, up to 1-month post-calving. Lip+ODN-CpG+Rec administration induced an increase in blood IgG levels, against the 4 evaluated antigens, and IgG1 and IgG2 production, with higher levels of this first subtype. In this group, specific IgG levels in milk tended to be higher at calving. Finally, it was demonstrated that the antibodies induced by Lip+ODN-CpG+Rec formulation would be able to inhibit the hemolytic activity of wild-type *S. aureus* α - and β -toxins.

Based on these results, we conclude that it is possible to induce a specific humoral immune response in cattle, by the administration of a subunit vaccine, using cationic liposomes

supplemented with ODN-CpG as adjuvant. Also, we suggest the implementation of earlier vaccination programs could improve the efficacy of a new vaccine.

In the second chapter, diverse liposomal formulations loaded with different immunostimulants were obtained. The immunostimulants incorporated in these formulations, alternatively, were: an ODN-CpG, a gemini-type aminoacidic surfactant (AG2-C16) and a hydrophobized oligosaccharide, O-palmitoylmannan (OPM), as well as the combination of ODN-CpG with AG2-C16 or OPM. The formulations characterization showed that the addition of the different immunostimulants did not generate changes in liposomes morphology, maintaining the spherical conformation and sizes between 150-450 nm. Also, it was observed that ODN-CpG decreases the liposomes stability. This effect could be counteracted by AG2-C16 or OPM addition in the formulation. Moreover, it was demonstrated that liposomes could protect the oligonucleotide from DNases action, allowing the use of a biocompatible and low-cost ODN-CpG with natural bonds, as immunostimulant.

Subsequently, the adjuvant capacity of the formulations in a murine experimental model was studied. This study evaluated the immune response induced in female BALB/c mice by the free antigen (rClfA) and three liposomal formulations: Lip+ODN-CpG+rClfA; Lip+AG2-C16+rClfA and Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA, during two independent trials. During the first trial, using 2 doses administered three weeks apart, the kinetics of the humoral immune response in blood and vaginal mucosa was studied, up to 3 weeks after the last dose. In the second study, 10 days after the second dose, a pre-sacrifice booster was applied and the cellular response was evaluated. Lymph node cells, obtained at sacrifice, were analyzed by flow cytometry to assess the IL-4, IL-17 and IFN- γ production by CD4+ and CD8+ T lymphocytes. This assay was repeated using female C57BL/6J mice and incorporating 2 experimental groups: Lip+OPM+rClfA and Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA. All three immunostimulants, ODN-CpG, AG2-C16 and OPM, when formulated in liposomes, were able to stimulate a humoral immune response, characterized by high blood IgG titers, with high levels of IgG1 and IgG2a or IgG2c subtypes, in BALB/c or C57BL/6J strains, respectively. The liposomal formulations also generated an increase in vaginal IgG levels, with the absence of specific IgA. Regarding the cellular response, Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA formulation was able to induce Th1, Th2 and Th17 profiles, and IFN- γ producing Tc lymphocytes. Considering that this immune response profile is desired for the control of *S. aureus* infections, we suggest the adjuvant Lip+AG2-C16+ODN-CpG as a potential candidate for next trials in bovines. Additionally, since this formulation also stimulated CD8+ T cells to produce IFN- γ , we propose this adjuvant as an alternative in the design of viral or cancer preventive vaccines.

Finally, in the second chapter, the potential of different formulations in transdermal immunization was studied. Firstly, the ability of the different formulations to transport the Lucifer Yellow (LY) fluorescent dye was evaluated *in vitro*, through a reconstituted mouse epidermis

(EMR). This test showed that AG2-C16 incorporation into liposomal formulations, increased the dye passage through the EMR. Therefore, it is possible to consider Lip+AG2-C16 formulation as a delivery system for topical administration of active ingredients. Secondly, the capacity of the different formulations, and their individual components, to stimulate *in vitro* skin keratinocytes and fibroblasts was studied. Formulations that contained OPM as an immunostimulant were able to stimulate the expression of proinflammatory chemokines and cytokines in fibroblasts. Indeed, it was detected increased levels of chemoattractants for Th1, Th17 and Tc lymphocytes, as well as for neutrophils, cells required for effective control of *S. aureus* at the infection site. The evaluated formulations were not able to activate keratinocytes. Considering these results, we suggest the use of formulations containing OPM in microinjection or intradermal immunization models. Likewise, the use of formulations containing both, OPM and AG2-C16, could be considered for the application of transcutaneous immunization.

The results presented in this thesis, demonstrate that cationic liposomes constitute a versatile adjuvant system, which allows the selection of the proper immunostimulants, depending on the needed immune response characteristics.

RÉSUMÉ

Les estimations montrent que les infections à *Staphylococcus aureus* représentent 20 à 25% des infections nosocomiales, conduisant à de sérieuses complications pouvant augmenter par 3 la durée d'hospitalisation et par 5 le risque de décès des patients infectés. De plus, la mastite bovine est un exemple des effets de ce pathogène dans le domaine vétérinaire. A ce jour, à la fois en médecine humaine et vétérinaire, le contrôle de la dissémination de ce pathogène est basé sur la prévention, pour laquelle la composante clé est l'hygiène, ainsi que les thérapies antibiotiques une fois l'infection détectée. Cependant *S. aureus* a une capacité extraordinaire à développer une résistance et l'usage excessif d'antibiotiques conduit au développement de souches multi-résistantes. Par conséquent, de nouveaux outils sont nécessaires dans la prévention des infections à *S. aureus*.

Staphylococcus aureus fait partie de la liste prioritaire des bactéries résistantes aux antibiotiques publiée par l'OMS, faisant du développement de vaccins une préoccupation première. Cependant, à ce jour, aucun vaccin n'est approuvé pour une utilisation chez l'homme. Dans le domaine vétérinaire, il existe deux vaccins commerciaux pour le contrôle de la mastite bovine, mais aucun d'eux n'est vraiment efficace dans la prévention de nouvelles infections. Ce manque d'efficacité peut être associé à la présence de multiples facteurs de virulence chez *S. aureus*, qui contribue à la pathogenèse de l'infection. Par conséquent, il y a un accord général sur le besoin de combiner plusieurs antigènes dans les vaccins, pour générer une réponse immune capable de bloquer les étapes clés de la pathogenèse de *Staphylococcus*. En outre, certains auteurs suggèrent que l'élément clé pour un contrôle efficace des infections à *S. aureus* est l'induction d'une réponse immune Th1/Th17.

L'adjuvant utilisé dans les vaccins est un facteur essentiel pour son efficacité. La combinaison appropriée d'antigènes et d'adjuvants devient un élément crucial pour formuler un vaccin efficace contre *S. aureus*. Une des nouvelles générations d'adjuvant concerne les liposomes, des vésicules phospholipidiques capables de favoriser le développement de réponses immunes spécifiques en transportant l'antigène avec des molécules immunostimulantes. Notre groupe de recherche a mis au point un adjuvant cationique basé sur les liposomes, supplémenté avec des oligodésoxynucléotides comportant des motifs CpG comme immunostimulant (ODN-CpG). Son utilisation chez la souris BALB/c, en utilisant un modèle d'antigène protéique, conduit à la génération de forts titres en anticorps, avec une production d'IgG1 et IgG2a et à la stimulation de lymphocytes T produisant de l'IFN- γ , sans effets néfastes.

Dans ce contexte, nous avons travaillé sur deux objectifs principaux. Premièrement, nous avons étudié la réponse immune induite chez les veaux, les génisses et les vaches enceintes après immunisation avec une sous-unité vaccinale composé de différents antigènes recombinants de *S.*

aureus, formulés avec des adjuvants liposomaux préalablement évalués chez la souris par notre groupe. Deuxièmement, nous avons généré différentes formulations liposomales contenant différents immunostimulants combinés à l'antigène recombinant de *S. aureus*, Clumping Factor (rClfA). Nous avons ensuite étudié leur capacité à induire une réponse immune efficace dans le modèle murin expérimental. De plus, nous avons évalué la capacité des formulations liposomales en tant que vecteur et adjuvant dans l'administration transdermique et intradermique du vaccin.

Dans le premier chapitre, nous présentons les résultats obtenus dans le bétail après immunisation avec une sous-unité prototype de vaccin contre *S. aureus*. Dans un premier essai, des génisses âgées de 6 à 8 mois ont été immunisées avec 3 doses d'immunogènes contenant les antigènes de *S. aureus* fibronectin-binding protein (rFnBPA) and rClfA. Une quatrième dose a été administrée un an plus tard et un rappel unique 21 jours avant le vêlage. L'immunogène fut alternativement formulé avec des liposomes (Lip), de l'ODN-CpG, des liposomes avec ODN-CpG (Lip + ODN-CpG) ou de l'hydroxyde d'aluminium (Al(OH)₃). La réponse humorale a été évaluée dans le sang tout au long du protocole d'immunisation et dans le lait au début de la lactation. Après les 3 premières doses, les groupes Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA et Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA ont atteint les plus forts niveaux d'IgG dans le sang. Après la quatrième dose, les deux formulations ont généré une augmentation rapide des niveaux d'IgG dans le sang, qui sont restés élevés 60 jours après le rappel. Une réponse IgG similaire a été observée après le rappel effectué avant le vêlage. La production d'IgG1 dans le sang a été stimulée dans tous les groupes expérimentaux, mais seul Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA a pu induire une production d'IgG2 spécifiques. Dans les échantillons de lait, des niveaux élevés d'IgG ont été retrouvés dans tous les groupes expérimentaux, caractérisés par une production d'IgG1 mais une absence d'IgG2. Nous avons également démontré que, après le rappel pré-vêlage, les anticorps générés dans les groupes Lip+rFnBPA/rClfA et Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA ont la capacité de diminuer la fixation de *S. aureus* au fibrinogène. Ces résultats nous permettent de conclure que l'immunisation avec des protéines recombinantes formulées avec des liposomes cationiques adjuvants et de l'ODN-CpG est une méthode viable pour générer une réponse humorale forte, avec production d'IgG2a spécifiques et l'induction d'une mémoire immunitaire. Ainsi, nous avons sélectionné cet adjuvant pour l'évaluer dans la dernière étape du programme d'immunisation au cours de la gestation.

Dans ce deuxième essai, des génisses et des vaches enceintes ont été immunisées au cours du dernier trimestre de la gestation. Les animaux ont été divisés de manière aléatoire en deux groupes. Le groupe traité a été immunisé par la formulation Lip+ODN-CpG+Rec, contenant les antigènes de *S. aureus* rFnBPA, rClfA, α -toxin et β -toxin comme immunogènes. Le second groupe constitue le groupe contrôle non-immunisé. Le groupe traité a reçu deux doses avant le vêlage. La réponse humorale a été évaluée dans le sang tout au long du protocole d'immunisation et dans le lait, jusqu'à un mois après le vêlage. L'administration de Lip+ODN-CpG+Rec a induit

une augmentation dans le sang des niveaux d'IgG dirigées contre les 4 antigènes testés, une production à la fois d'IgG1 et d'IgG2, avec des niveaux plus élevés pour le premier isotype. Dans ce groupe, les niveaux d'IgG tendent à être plus élevés dans le lait au moment du vêlage. Enfin, nous avons démontré que les anticorps induits par les formulations Lip+ODN-CpG+Rec sont capables d'inhiber l'activité hémolytiques des toxines α et β des souches sauvages de *S. aureus*.

Sur la base de ces résultats, nous concluons qu'il est possible d'induire une réponse immune humorale efficace dans le bétail, par l'administration de sous-unités vaccinales utilisant des liposomes cationiques supplémentés en ODN-CpG comme adjuvant. Nous suggérons aussi que la mise en œuvre de programmes de vaccination plus précoces pourrait améliorer l'efficacité d'un nouveau vaccin.

Dans le second chapitre, nous avons obtenu diverses formulations liposomales chargées avec différents immunostimulants : ODN-CpG, un surfactant aminoacide de type gemini (AG2-C16) et un oligosaccharide hydrophobisé, O-palmitoyl-mannane (OPM), ainsi que la combinaison de ODN-CpG avec AG2-C16 ou l'OPM de manière alternative. La caractérisation des formulations a montré que l'addition des différents immunostimulants ne générerait pas de changement dans la morphologie des liposomes, qui maintiennent leur conformation sphérique et leur taille entre 150 et 450 nm. De même, il a été observé que ODN-CpG diminue la stabilité des liposomes. Cet effet peut être contrecarré par l'ajout de AG2-C16 ou de l'OPM dans la formulation. De plus, nous avons démontré que les liposomes peuvent protéger les oligodésoxynucléotides de l'action des DNAses, permettant l'utilisation d'ODN-CpG biocompatibles et à bas coût avec des liaisons naturelles, comme immunostimulant.

Par la suite, nous avons étudié la capacité adjuvante des formulations dans un modèle expérimental murin. Nous avons étudié la réponse immune induite chez des souris femelles BALB/c par l'antigène libre (rClfA) et les trois formulations liposomales : Lip+ODN-CpG+rClfA, Lip+AG2-C16+rClfA and Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA. Cette étude a été réalisée dans deux expériences indépendantes. Dans la première, en utilisant 2 doses administrées à 3 semaines d'intervalles, nous avons étudié la cinétique de la réponse immune humorale dans le sang et la muqueuse vaginale, jusqu'à 3 semaines après la dernière dose injectée. Dans la deuxième expérience, dix jours après la seconde dose, nous avons réalisé un rappel avant le sacrifice des animaux et évalué la réponse cellulaire. Les cellules des ganglions lymphatiques obtenues lors du sacrifice ont été analysés en cytométrie en flux pour déterminer les niveaux de production d'IL-4, d'IL-17 et d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Cet essai a été répété avec des souris femelles C57BL/6J en incorporant deux groupes expérimentaux : Lip+OPM+rClfA et Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA. Les trois immunostimulants, ODN-CpG, AG2-C16 and OPM, lorsqu'ils sont formulés dans des liposomes, sont capables de stimuler la réponse humorale, caractérisée par des titres élevés en IgG dans le sang, comportant des niveaux élevés d'isotypes IgG1 et IgG2a ou IgG2c dans les lignées BALB/C ou C57BL/6J,

respectivement. Les formulations liposomales ont également conduit à des niveaux élevés d'IgG dans la muqueuse vaginale, en l'absence d'IgA spécifiques. En ce qui concerne la réponse cellulaire, la formulation Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA est capable d'induire des profils Th1, Th2 et Th17 et la production de lymphocytes Tc produisant de l'IFN- γ . Considérant qu'il s'agit d'un profil désiré pour le contrôle des infections à *S. aureus*, nous suggérons l'utilisation de l'adjuvant Lip+AG2-C16+ODN-CpG comme candidat potentiel pour les prochains essais chez les bovins. De plus, puisque cette formulation stimulait également la production d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺, nous proposons cet adjuvant comme alternative au développement de vaccins préventifs contre les virus et les cancers.

Enfin, dans le second chapitre, nous avons étudié le potentiel de différentes formulations dans l'immunisation transcutanée. Tout d'abord, nous avons évalué *in vitro* la capacité des différentes formulations à transporter la sonde fluorescente Lucifer Yellow (LY) au travers d'épidermes murins reconstitués (RME). Ce test a montré que l'incorporation de AG2-C16 dans les formulations liposomales augmente le passage de la sonde à travers les RME. Il est donc possible de considérer la formulation Lip+AG2-C16 comme un système d'administration topique pour des principes actifs. Nous avons ensuite étudié la capacité de différentes formulations, et de leurs composants individuels, à stimuler *in vitro* les kératinocytes et les fibroblastes de la peau. Les formulations qui contiennent OPM, comme immunostimulant, sont capables de stimuler l'expression de chimiokines et de cytokines proinflammatoires par les fibroblastes. En effet, nous avons pu détecter des niveaux accrus de chimiokines attractrices de cellules Th1, Th17 et Tc ainsi que de polynucléaires neutrophiles, des cellules requises pour le contrôle de *S. aureus* au site d'infection. Les formulations testées n'ont pas permis de stimuler les kératinocytes. Compte-tenu de ces résultats, nous suggérons l'utilisation de formulations contenant de l'OPM dans les modèles de micro-injections ou d'immunisation intradermique. De même, l'utilisation de formulations contenant à la fois de l'OPM et AG2-C16 peut être considérée de manière applicative dans l'immunisation transcutanée.

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que les liposomes cationiques constituent un système adjuvant polyvalent, qui permet la sélection d'immunostimulants appropriés en fonction des caractéristiques souhaitées de la réponse immune.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Staphylococcus aureus, una bacteria comensal y patógena

Staphylococcus aureus es un coco anaerobio facultativo, grampositivo, productor de catalasa, inmóvil y no esporulado. Se desarrolla en agrupaciones a modo de racimos y forma biofilm, lo que le permite sobrevivir bien en condiciones secas, pudiéndose aislar a partir de superficies en una variedad de entornos, como el doméstico, centros de salud e instalaciones de elaboración de alimentos [1].

Esta bacteria se distribuye ampliamente, en números bajos, en la piel y las membranas mucosas de los animales de sangre caliente. Normalmente, su presencia es transitoria y no forma parte de la flora residente en la piel, sin embargo, si se altera el equilibrio normal por mecanismos como lavado, uso frecuente de antisépticos o tratamiento con antibióticos, *S. aureus* puede establecerse como parte de la flora residente [1]. De esta forma, es capaz de colonizar narinas, axilas, faringe y otras mucosas, así como la superficie epitelial en aproximadamente el 30% de la población, convirtiéndose así en un comensal de gran distribución mundial [2].

Si bien, en individuos sanos, la continuidad de la piel y mucosas es usualmente una protección suficiente para evitar las infecciones estafilocócicas, éstas representan la principal vía de acceso de este patógeno, siendo el 90% de las infecciones el resultado de interrupciones en estas barreras. Se estima que *S. aureus* es el responsable del 20-25% de las infecciones intra-hospitalarias, con complicaciones serias como bacteriemia, endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, entre otras, prolongando así tres veces los estadios de hospitalización y quintuplicando el riesgo de muerte en pacientes infectados [3,4].

A su vez, se conoce que *S. aureus* es capaz de infectar tanto al Hombre como a otros animales. La mastitis bovina es un claro ejemplo de los efectos de este patógeno en el ámbito veterinario, ya que *S. aureus* resulta el microorganismo más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina [5], como en otros países de gran desarrollo lechero [6].

Prevención y tratamiento de la infección

El surgimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) y el gran número de infecciones intra-hospitalarias colocan a los métodos de prevención como uno de los pilares fundamentales en el control de la propagación de este patógeno. Hasta el momento, la estrategia más efectiva es la adhesión a los principios básicos para el control de infecciones, donde el componente clave es la higiene [7].

Respecto al cuidado personal, distintas instituciones coinciden en que es posible limitar el contagio si se mantienen las manos limpias mediante el lavado meticuloso con agua y jabón o la utilización regular de sanitizantes para manos de base alcohólica. Por otro lado, recomiendan

mantener las heridas limpias y cubiertas hasta su cicatrización, evitar el contacto con heridas y vendajes de otras personas, y no compartir artículos personales como toallas, ropa o cosméticos [8]. Asimismo, respecto al contacto del personal de salud con pacientes, se indica tanto el lavado y desinfección de manos frecuente como la utilización de guantes descartables y vestimenta que cubra la piel del trabajador, para minimizar el contacto con heridas infectadas, secreciones y materiales contaminados, y así evitar la propagación entre pacientes. En el caso de pacientes que serán sometidos a tratamientos quirúrgicos, las medidas preventivas más importantes son, el lavado antiséptico de las manos de los profesionales y del sitio quirúrgico del paciente, la utilización de técnicas quirúrgicas asépticas y la profilaxis con antimicrobianos [7]. Por su lado, respecto al control de SARM en centros de atención médica, la Organización Mundial de la Salud (OMS) elaboró una guía de recomendaciones que abarca desde las medidas mínimas para centros de salud con recursos limitados, hasta las medidas máximas que se deben aplicar para la erradicación del agente si se detectan pacientes infectados en unidades especiales como terapia intensiva, neonatología y ortopedia. Estas prácticas van desde el lavado antiséptico de manos y el uso de barreras de protección en el personal, hasta la realización de pruebas de detección de SARM en las heridas y posibles sitios de infección de todos los pacientes y trabajadores, y el aislamiento de los pacientes infectados y portadores [9].

Si bien, una vez detectada la infección en el paciente, el tratamiento depende de la patología producida, en la mayoría de los casos se basa en la terapia antibiótica sistémica y, en lo posible, en la identificación del foco infeccioso y su remoción de ser necesario. Dependiendo del tipo de patología la terapia antibiótica puede durar desde 7-14 días hasta meses y requerir la utilización de más de un antibiótico, por lo que resulta de suma importancia la detección temprana de la infección y la determinación de la posible resistencia a los antibióticos de la cepa de *S. aureus* responsable [10].

Staphylococcus aureus presenta una extraordinaria habilidad para desarrollar resistencia a los antibióticos a los que es expuesto. Es así como el uso desmedido de antibióticos, no sólo en medicina humana, sino también en el ámbito veterinario y en particular en la cría de animales, ha dado lugar a un rápido desarrollo de cepas resistentes a distintos antibióticos [11]. Por otro lado, a pesar de que existan guías para la prevención de las infecciones por SARM, el alto costo asociado a estos protocolos conlleva a que, en determinados países, muchos de ellos endémicos, estas guías no sean totalmente implementadas, por no contar con los recursos y financiación necesarios [12–14]. Es por esto, que es necesario el surgimiento de nuevas herramientas para la prevención de las infecciones causadas por *S. aureus*.

Factores de virulencia de *S. aureus* y evasión del sistema inmune

Staphylococcus aureus se caracteriza por la presencia de múltiples factores de virulencia (Fig. 1), que contribuyen a la patogénesis de la infección. Estos componentes tienen roles

solapados y pueden actuar individualmente o en conjunto [15]. Durante el cultivo *in vitro* del microorganismo, los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana se expresan preferentemente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los factores de secreción son liberados en la fase poslogarítmica (Fig. 1). Se ha propuesto que esta expresión bifásica organizaría el proceso infeccioso, permitiendo que inicialmente las adhesinas de superficie reconozcan las estructuras del huésped facilitando la colonización, para, posteriormente, multiplicarse y secretar toxinas y enzimas capaces de dañar directa o indirectamente al huésped. Asimismo, se ha propuesto que, para lograr la persistencia intracelular, *S. aureus* sería capaz de regular negativamente la expresión de los factores de virulencia, evadiendo la respuesta inmune del huésped y conduciendo a la cronicidad de la infección [16]. Si bien *S. aureus* presenta numerosos factores de virulencia, a continuación, se describirán aquellos asociados al desarrollo de la presente tesis.

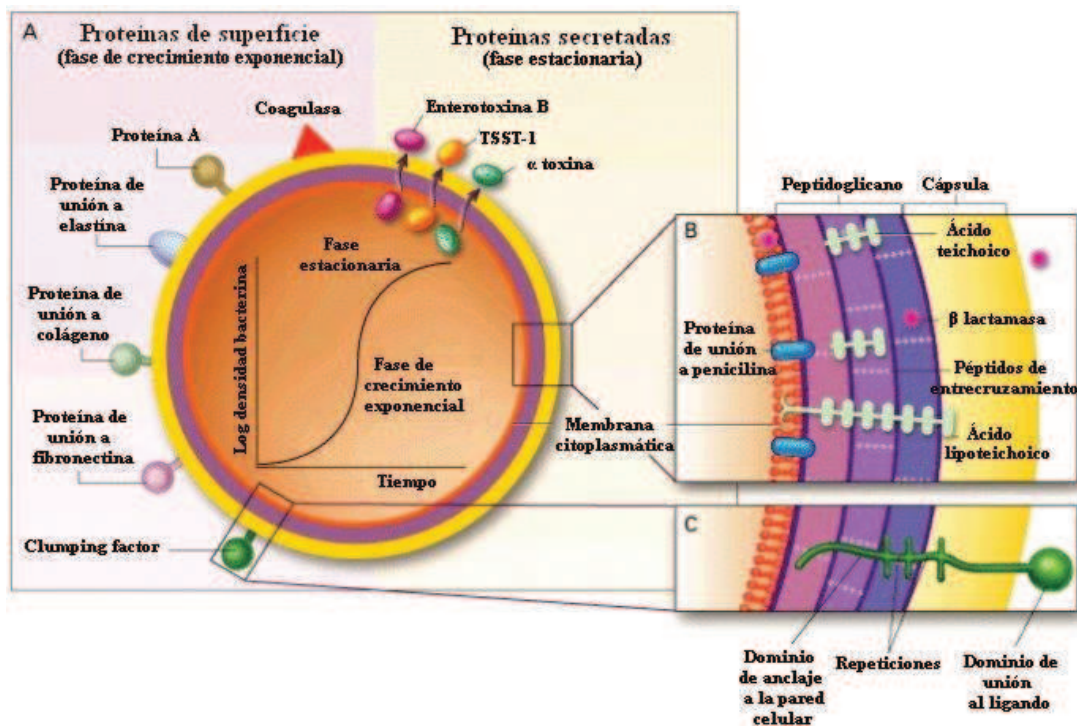


Fig. 1: Estructura del *S. aureus*. El panel A muestra las proteínas de superficie y secretadas. La síntesis de muchas de estas proteínas depende, como se muestra en la gráfica, de la fase de crecimiento en la que se encuentra la bacteria y están controladas por genes regulatorios. Los paneles B y C muestran un corte transversal de la pared celular. Muchas de las proteínas de superficie tienen una organización estructural semejante a la de Clf, incluyendo segmentos repetidos de aminoácidos, como se muestra en el panel C.

Imagen adaptada de [15].

Dentro de los procesos de evasión de la respuesta inmune se destaca la capacidad de *S. aureus* de internalizarse en células epiteliales y fagocíticas no profesionales. Este mecanismo ha sido principalmente atribuido a la expresión de la proteína de superficie de unión a Fibronectina (FnBP), un factor de virulencia presente en la mayoría de las cepas patógenas [16,17]. La adhesión

a las células del huésped, involucrarían, principalmente, la formación de un puente de fibronectina entre la $\alpha 5\beta 1$ integrina presente en las células del huésped y la FnBP expresada por *S. aureus* (Fig. 2-A) [18]. Esta interacción genera una cascada de señalización intracelular en la célula del huésped, que conlleva a la reorganización del citoesqueleto de actina y consiguientemente a la endocitosis de la bacteria [19]. Si bien existen otras interacciones capaces de mediar la internalización de la bacteria (Fig. 2-B), la vía de la FnBP-Fn- $\alpha 5\beta 1$ integrina es considerada el proceso principal [18]. Otros autores, han estudiado la capacidad protectora de los anticuerpos específicos contra FnBP, producidos mediante la inmunización del huésped con este antígeno, en modelos murinos y bovinos de infección intramamaria. En estos estudios, pudieron demostrar que estos anticuerpos son capaces de interferir en la interacción de FnBP con la fibronectina, disminuyendo, en consecuencia, el número de bacterias aisladas en las glándulas mamarias infectadas y, consiguientemente, disminuyendo el daño en el tejido y el cuadro clínico (revisado por [16]). Estos antecedentes sitúan a FnBP como uno de los factores de virulencia claves de la patogénesis estafilocócica.

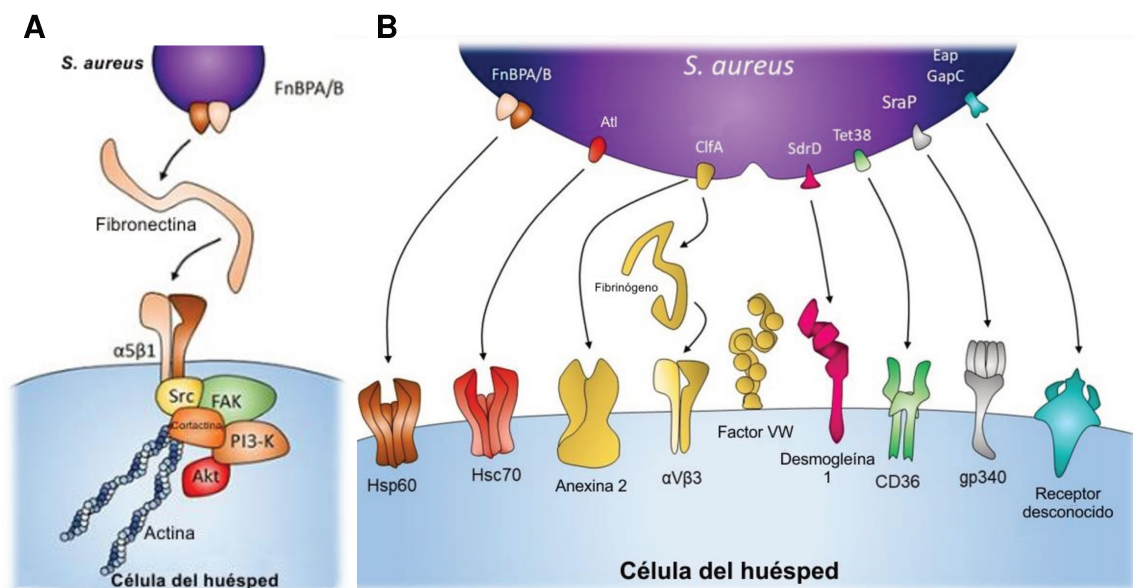


Fig. 2: Mecanismos de adherencia e internalización de *S. aureus* a la célula huésped. **A-** Diagrama de la adhesión mediada por la formación de un puente de fibronectina, que involucra su unión a la FnBP de *S. aureus* y a la $\alpha 5\beta 1$ integrina de la célula del huésped, conocida como la vía FnBP-Fn- $\alpha 5\beta 1$ integrina. **B-** Mecanismos secundarios de adherencia e internalización en la célula huésped, mediados por distintas adhesinas bacterianas. Imagen adaptada de [18].

Otra adhesina de superficie presente en la mayoría de las cepas de *S. aureus* es la proteína de unión a fibrinógeno, denominado factor de agregación (Clumping factor, Clf), siendo que su interacción con el fibrinógeno plasmático permite una aglomeración instantánea de las células bacterianas [20]. Como molécula de adhesión (Fig. 2-B), Clf, puede interactuar directamente con la célula del huésped, a través de su unión a la Anexina 2, o bien formando un puente de

fibrinógeno que le permite su unión a la integrina $\alpha V\beta 3$, favoreciendo, como se describió para FnBP, su posterior internalización [18]. En cultivos *in vitro* de la bacteria en contacto con células polimorfonucleares se demostró que la expresión de Clf está asociada a propiedades antifagocíticas y, en presencia de fibrinógeno, este efecto es mayor [21]. Asimismo, se ha reportado que los anticuerpos específicos contra este factor de virulencia, obtenidos en ratones y bovinos inmunizados con Clf, son capaces de opsonizar la bacteria, inhibir su adhesión celular y favorecer su fagocitosis mediada por células polimorfonucleares, demostrando su importancia en la patogenia de *S. aureus* [16].

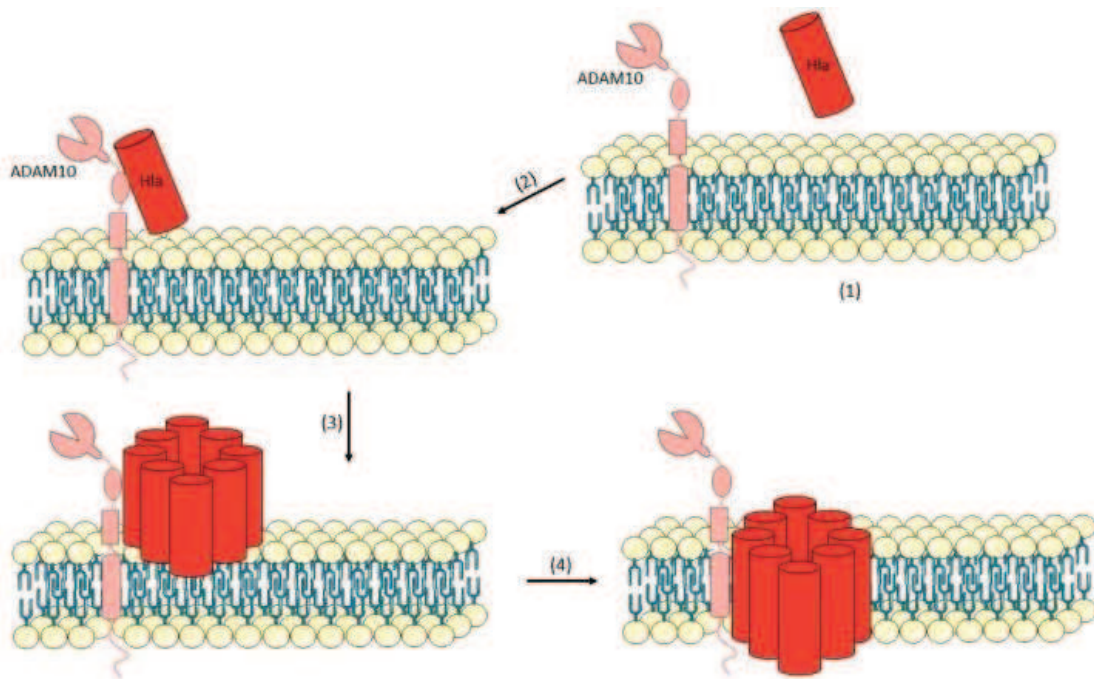


Fig. 3: Mecanismos de acción de la α -toxina (Hla) de *S. aureus*. 1- La Hla es secretada como un monómero soluble en agua. 2- La Hla se une a la proteína de transmembrana ADAM10, la cual es un receptor celular para Hla. 3- La toxina forma un pre-poro, para esto se oligomeriza en un heptámero sobre la membrana plasmática. 4- El pre-poro se inserta en la membrana celular, dando lugar a la formación de un canal transmembrana. Imagen extraída de [24].

Por otro lado, *S. aureus* es capaz de secretar diversas toxinas. Entre ellas, la α -toxina, también denominada α -hemolisina o Hla, es una proteína tóxica para un amplio rango de células de mamíferos, incluyendo eritrocitos, células epiteliales, fibroblastos, monocitos, macrófagos y linfocitos. Este factor de virulencia se encuentra ampliamente distribuido en las cepas clínicas y su función principal es convertir el tejido del huésped en nutrientes para la bacteria que la expresa [16,22]. Se ha postulado que la α -toxina puede actuar por dos mecanismos diferentes dependiendo de la concentración relativa alcanzada en el huésped y del tipo de célula expuesta. Por un lado, a bajas concentraciones, la toxina se uniría al receptor de superficie ADAM10, lo que desencadenaría la formación de un poro heptamérico (Fig. 3). Este poro permitiría una rápida

liberación de ATP y de iones potasio y permitiría el ingreso de calcio extracelular a la célula, resultando en la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y, eventualmente, en la apoptosis celular. Por otro lado, altas concentraciones de α -toxina permitirían la absorción inespecífica de la toxina en la bicapa lipídica, formando grandes poros que permiten el ingreso descontrolado de calcio y resultando en una necrosis masiva y en la activación de otras reacciones celulares secundarias [23,24]. Asimismo, Goldmann y col. reportaron que *S. aureus* sería capaz de responder a los mecanismos microbicidas extracelulares de los mastocitos, aumentando la expresión de FnBP e induciendo un incremento, mediado por la interacción α -toxina-ADAM10, de la expresión de β 1 integrina en la célula huésped, resultando en un aumento de la internalización bacteriana por la vía FnBP-Fn- α 5 β 1 integrina [25]. Además, la α -toxina ha sido descrita como un factor clave en la supervivencia intracelular del patógeno, ya que es capaz de inducir, en la célula infectada, una autofagia disfuncional. Estos autofagosomas son incapaces de madurar y de unirse al lisosoma, brindando un nicho para las bacterias intracelulares, donde pueden sobrevivir y replicarse, antes de escapar al citoplasma y, eventualmente, acabar con la célula del huésped [26]. Respecto a su potencial como inmunógeno, en estudios de inmunización en conejos y bovinos demostró inducir la producción de anticuerpos específicos capaces de inhibir su capacidad hemolítica. Asimismo, en un desafío experimental, la inmunización pasiva de ratones con anticuerpos generados en conejo, disminuyó los recuentos de *S. aureus* en pulmón, demostrando la importancia del bloqueo de este factor de virulencia en el control de la infección [16].

Por su lado, la β -toxina de *S. aureus*, también denominada hemolisina- β es una esfingomielinasa dependiente de magnesio, capaz de hidrolizar la esfingomielina presente en la membrana plasmática de las células del huésped, generando fosfocolina y ceramida. Dependiendo del largo de la cadena del ácido graso o el metabolismo, estas ceramidas pueden generar diferentes efectos sobre las células del huésped, incluyendo la activación de MAP quinasas, cambios en la forma celular e incluso, apoptosis [23]. El rol de esta toxina en la enfermedad no ha sido claramente dilucidado. Se conoce que la β -toxina es producida en grandes cantidades por cepas aisladas de casos de mastitis bovinas e infecciones epiteliales crónicas humanas [24]. Si bien, esta toxina no sería capaz de lisar por sí sola la mayoría de las células del huésped, las dejaría susceptibles para la acción de otros agentes líticos, como por ejemplo la α -toxina. De hecho, debido a las diferencias en el contenido de esfingomielina en membrana, su efecto citotóxico es dependiente del tipo celular y de la especie infectada, lo que sugiere que su actividad primaria es modular los procesos del huésped que afectan la patogénesis, en lugar de matar la célula directamente [23]. En particular, se conoce que la β -toxina es citotóxica para queratinocitos, leucocitos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos T humanos e inhibe la expresión de interleuquina-8 (IL-8), una citoquina proinflamatoria, en células endoteliales. Estos efectos podrían contribuir al escape de *S. aureus* del fagosoma y a la formación de biofilm [24]. Además,

en un ensayo de proliferación *in vitro* de linfocitos T de sangre periférica humanos que fueron estimulados con un superantígeno, la toxina del síndrome de shock tóxico 1 (TSST-1), se observó que la presencia de β -toxina en el cultivo inducía una disminución en la proliferación, demostrando su capacidad de actuar en la evasión de los mecanismos inmunes adaptativos, mediante la interacción con factores de virulencia accesorios [27]. A pesar de su alta prevalencia en cepas clínicas, existen pocos antecedentes de la utilización de β -toxina como inmunógeno. En estudios previos de nuestro grupo, se utilizó un inmunógeno experimental que contenía una β -toxina de *S. aureus* recombinante en la inmunización de vaquillonas, demostrándose que los anticuerpos específicos contra este factor de virulencia son capaces de bloquear su actividad hemolítica [28].

La vacunación como una herramienta para la prevención

El uso de la vacunación para prevenir enfermedades infecciosas es el éxito más grande de la medicina del último siglo. Para enfermedades como la viruela, la poliomielitis, la difteria y el sarampión, la implementación de la vacunación resultó en una reducción de la mortalidad causada por estas infecciones, de más del 99,9% en muchos países [29].

Staphylococcus aureus fue incluido en la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos publicada por la OMS, lo que convierte al desarrollo de una vacuna contra esta bacteria en una prioridad mundial [30]. Si bien distintos candidatos vacunales han demostrado generar protección en la fase preclínica, hasta el momento, ninguno ha superado la Fase III en pruebas clínicas (Tabla 1), por lo que no existen vacunas aprobadas para su uso en humanos contra este patógeno [31]. Por su lado, en el ámbito veterinario, existen 2 vacunas comerciales para el control de la mastitis bovina, causada por *S. aureus*, que se abordarán en la introducción del Capítulo 1 de la presente tesis.

Distintos factores han sido asociados al fracaso de algunos candidatos vacunales evaluados hasta el momento. Por ejemplo, en el caso de la vacuna StaphVAX, esta no fue capaz de superar la Fase Clínica 3 (Tabla 1). Algunos autores asocian su falta de protección, por un lado, a su contenido de sólo dos antígenos individuales sugiriendo que para el diseño de una vacuna exitosa se requeriría la inclusión de múltiples antígenos, y por otro, a que la expresión de los polisacáridos capsulares (CP) de *S. aureus* se encuentra limitada a la fase estacionaria de su crecimiento [31,32]. Así también, otros autores han señalado que la discontinuidad de este candidato vacunal se debió a la inconsistencia existente entre lotes de producción, ya que en un primer ensayo de Fase 3, fue capaz de disminuir los casos de bacteriemia, en pacientes que recibían diálisis, hasta en un 57%, mientras que, en un segundo ensayo con un mayor número de pacientes, no se encontraron diferencias respecto al grupo placebo [33]. Otro candidato que no superó la fase 3, fue la vacuna V710 patrocinada por Merck que contaba con un único antígeno, la proteína de superficie reguladora de hierro B (IsdB). Este ensayo finalizó cuando un análisis

intermedio mostró un aumento estadísticamente significativo en la tasa de mortalidad debido a infecciones causadas por *S. aureus* y una tasa significativamente mayor de otros eventos adversos en aquellos pacientes inmunizados respecto al grupo placebo [33,34].

Tabla 1: Estado actual del desarrollo de vacunas para la profilaxis activa contra *S. aureus*.

Vacuna	Patrocinador	Antígenos	Fase ^a	Resultados
V710	Merck	IsdB	3	Se encontró una asociación entre su administración y el aumento de la mortalidad causada por infecciones posoperatorias con <i>S. aureus</i> , en pacientes sometidos a cirugía cardiotorácica.
StaphVAX	Nabi	CP5 y CP8 conjugados a exoproteína A de <i>P. auriginosa</i>	3	No generó protección contra bacteriemias en pacientes que recibían hemodiálisis.
SA4Ag	Pfizer	ClfA y MntC ^b recombinantes/CP5 y CP8 conjugados a CRM ₁₉₇ ^c	2	Demostró seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad con producción de anticuerpos bactericidas. Actualmente en fase 2b/3 en pacientes sometidos a cirugía de fusión espinal.
SA3Ag	Pfizer	ClfA recombinante /CP5 y CP8 conjugados a CRM ₁₉₇ ^c	1	Indujo una respuesta inmune con producción de anticuerpos neutralizantes. Se canceló su estudio para dar lugar a la vacuna SA4Ag.
rAT/rLukS-PV	Varios	α -toxina y Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) recombinantes	1	Demostró seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad con producción de anticuerpos neutralizantes de las toxinas.
GSK2392103A	GSK	CP5 y CP8 conjugados a TT ^d /mutante inactivada de α -toxina/ClfA y AS03B como adyuvante	1	Demostró seguridad y tolerabilidad. Generó una respuesta inmune humoral robusta luego de una única dosis, con producción de anticuerpos funcionales. Actualmente, no se encuentra en desarrollo activo.
NDV-3	NovaDigm Therapeutics	Proteína de adhesión Als3p de <i>Candida albicans</i> (homóloga a proteínas de superficie de <i>S. aureus</i>) con adyuvante de aluminio.	1	Demostró la capacidad de inducir la producción de IgG e IgA1 específicas. También se demostró una respuesta de memoria T con producción de IFN- γ e IL-17 ^a . Actualmente en fase 2.
SA75	Vaccine Research International	Bacteria completa inactivada	1	No se encontraron efectos adversos significativos. La respuesta humoral se obtuvo con una única dosis y aumentó hasta la tercera o cuarta dosis. No continúa en desarrollo activo.

^a Fase hasta la que se han reportado resultados.

^b Lipoproteína transportadora de manganeso C.

^c Mutante no tóxica de la toxina diftérica obtenida de *Corynebacterium diphtheriae* C7.

^d Toxoide tetánico.

La tabla fue elaborada a partir de los datos reportados por [31,33,35–38].

Por otro lado, distintos autores señalan que la mayoría de las vacunas evaluadas hasta el momento se han centrado en la inducción de una fuerte respuesta humoral, sin embargo, el rol de los anticuerpos opsonizantes en las infecciones estafilocócicas humanas es incierto, dado que un aumento en el título de anticuerpos específicos contra *S. aureus* no se correlaciona necesariamente con un aumento en la protección [4]. Más aún, distintos estudios han demostrado que la respuesta inmune mediada por linfocitos Th tiene un rol importante en el control de las infecciones causadas por este patógeno. Mientras que ratones deficientes en linfocitos B no resultaron ser más susceptibles a las infecciones sistémicas causadas por *S. aureus* respecto a animales *wild type* (WT), los ratones deficientes en linfocitos T, interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o IL-17A/F fueron, en todos los casos, hipersensibles a estas. Asimismo, en diferentes ensayos preclínicos, se ha demostrado que la protección generada por distintos candidatos vacunales depende de la inducción de linfocitos Th17 y la capacidad de estas células de incrementar la activación y el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección [4,32]. En conjunto, estos antecedentes señalan que la inducción de una inmunidad adaptativa de tipo Th1/Th17 debería estar en el foco del diseño de una vacuna para el control de las infecciones causadas por *S. aureus*.

La necesidad de un adyuvante

La naturaleza del adyuvante utilizado en la formulación de una vacuna, ha sido identificada como un factor crítico para el aumento de su eficacia. El término adyuvante deriva de la palabra en latín “*adjuvare*” que significa ayudar, y es asignado a los componentes capaces de inducir una respuesta inmune humoral y/o celular en el huésped, específica hacia un antígeno coadministrado [39]. Las vacunas vivas generalmente no requieren adyuvantes, ya que imitan la infección natural y, por lo tanto, son "adyuvantes naturales". Sin embargo, la mayoría de las vacunas inactivadas o a subunidades requieren de adyuvantes, ya que en su obtención se eliminan, en parte o totalmente, las características patogénicas de los microorganismos responsables de desencadenar la respuesta inmune [40]. El adyuvante ideal debe ser estable y con una vida útil prolongada, biodegradable, económico, inmunológicamente inerte, promotor de una respuesta inmune apropiada según el tipo de protección requerida, capaz de reducir el número de dosis necesarias para generar memoria inmunológica e, incluso, debería ser capaz de cumplir su propósito inmunoestimulante en huéspedes inmunocomprometidos [39–41].

Los beneficios de incorporar un adyuvante en una vacuna deben ser evaluados contra el riesgo de la posible existencia de efectos adversos, que pueden ir desde reacciones locales como dolor e inflamación en el sitio de aplicación, hasta reacciones sistémicas como náuseas, fiebre o alergia, entre otros. Habitualmente, cuanto más potente es la acción del adyuvante, mayor es la toxicidad del mismo, por lo que minimizar la toxicidad es uno de los mayores desafíos en el desarrollo de nuevos adyuvantes [41].

Tabla 2: Ejemplos de adyuvantes utilizados en vacunas con licencia comercial.

Adyuvante	Componentes	Vacunas	Efecto inmune
Aluminio	Sales de aluminio (Hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato hidroxifosfato de aluminio)	- DTPa - DTPa, polio y Hib - DTPc, Hib y Hepatitis B - DTPa, polio, Hib y Hepatitis B - Hepatitis A - Hepatitis B - VPH-6/11/16/18 - Influenza (H5N1) - Neumocócica conjugada	Aumenta la inflamación local, mejora la captación del antígeno por las APC. Estimula la producción de anticuerpos.
RC-529	MPL (Monofosforil lípido A) sintético	- Hepatitis B	El reconocimiento de MPL por TLR4 favorece las respuestas inmunes humorales y celulares, en particular Th1.
Virosomas	Vesículas lipídicas esféricas que incluyen las glicoproteínas virales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de influenza.	- Hepatitis A - Influenza (estacional)	Aumenta la captación por las APC. Puede interactuar con los linfocitos B conduciendo a la activación de los linfocitos T.
MF59™	Escualeno (emulsión aceite en agua).	- Influenza (H1N1) - Influenza (H5N1) - Influenza (estacional)	Aumenta el reclutamiento y activación de las APC. Promueve la captación del antígeno y la migración de células a los ganglios linfáticos.
Montanide™ ISA51	Aceite mineral y monooleato de manida (emulsión agua en aceite)	- Cáncer pulmonar de células no pequeñas	Induce una fuerte respuesta inmune con un perfil más seguro que el adyuvante de Freund, pero puede conducir a reacciones locales medias a severas.
AS04	MPL y sales de aluminio	- Hepatitis B - VPH-16/18	Estimula a través de TLR-4 incrementando la maduración de las APC y la activación de respuestas Th1.
AS03	α -tocoferol (Vitamina E), escualeno y polisorbato 80 (emulsión aceite en agua)	- Influenza (H5N1/H1N1)	Promueve la producción local de citoquinas y el reclutamiento de células de la inmunidad innata.
AS01	Liposomas, MPL y QS-21 (<i>Quillaja saponaria</i> Molina: fracción 21)	- Malaria - Herpes zoster	Estimula a través de la vía del TLR-4 y del inflammasoma NLRP3. Induce la producción temprana de IFN- γ . Incrementa la respuesta celular y humoral.
Emulsión aceite en agua termo-reversible	Escualeno y surfactantes (emulsión aceite en agua)	- Influenza (H1N1)	No reportado

DTPa, difteria pediátrica, tétanos y pertussis acelular; Hib, *Haemophilus influenzae* tipo b; DTPc, difteria pediátrica, tétanos y pertussis celular; VPH, virus del papiloma humano.

La tabla fue elaborada a partir de los datos reportados por [40,42,43].

Los adyuvantes pueden ejercer su acción mediante distintos mecanismos. Algunos lo hacen mediante la generación de depósitos de antígeno en el lugar de la inyección, permitiendo su liberación lenta, de manera que continúan estimulando el sistema inmune por un periodo prolongado, aumentando el reclutamiento y activación de células presentadoras de antígeno (APC). Otros son capaces de favorecer el procesamiento y presentación antigénica, o bien incluyen ligandos para los receptores de reconocimiento de patrones (RRP), estimulando la respuesta inmune innata y en consecuencia influenciando la respuesta inmune adaptativa, la que dependerá del receptor al que se dirigió el estímulo. Los blancos de acción pueden ser: receptores de tipo Toll (TLR), receptores de tipo NOD (NLR), receptores de tipo RIG-I (RLR) o receptores de lectina de tipo C (CLR). Cada uno de ellos es capaz de reconocer estructuras presentes en microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP). La activación de diferentes RRP, mediante el reconocimiento de PAMP específicos, conduce a la producción de distintos patrones de citoquinas, que orientarán la respuesta inmune hacia el perfil necesario para el control de la infección cursante, o bien, hacia el perfil que se desea obtener en el proceso de inmunización [41,44,45].

Si bien en las últimas décadas se han evaluado diversos adyuvantes y sistemas de *delivery* de antígenos en inmunógenos experimentales, los adyuvantes utilizados en vacunas de uso humano son relativamente pocos (Tabla 2) y presentan algunas desventajas. Por ejemplo, si bien el hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$) es el adyuvante más utilizado, es capaz de inducir una respuesta inmune humoral (Th2), pero fracasa en la inducción de la respuesta inmune celular (Th1). Por otro lado, los adyuvantes oleosos inducen una respuesta inmune más balanceada, aunque continúan siendo débiles en la inducción del perfil Th1, lo que sigue representando una dificultad para la obtención de inmunidad frente a infecciones intracelulares [39]. En cuanto a los candidatos vacunales para el control de las infecciones causadas por *S. aureus* evaluados en humanos (Tabla 1), se observa que a pesar de ser principalmente vacunas a subunidades muchas de ellas no contienen adyuvantes. Mientras que aquellas formulaciones en las que fueron incorporados, los desarrolladores optaron por la utilización de una sal de aluminio o del AS03, ambos capaces de inducir principalmente una respuesta humoral, pero con falencias para desarrollar una respuesta celular [40]. Asimismo, muchos candidatos vacunales, en fase preclínica, han demostrado ser eficaces en el control de las infecciones causadas por *S. aureus*, sin embargo, no pueden trasladarse a fase clínica por haber sido formulados con adyuvante de Freund, un adyuvante prohibido en humanos por inducir frecuentemente granulomas, abscesos estériles y necrosis ulcerativas en el sitio de inoculación [46,47]. Por su lado, en el ámbito veterinario si bien existen un número mayor de vacunas disponibles para distintas especies, los adyuvantes incorporados en las vacunas licenciadas son pocos. A pesar de que existe evidencia de que numerosas sustancias naturales y sintéticas pueden ser utilizadas para incrementar la eficacia de vacunas veterinarias, las disponibles comercialmente están formuladas principalmente

con sales de aluminio y emulsiones como el Montanide™, y en menor medida con saponinas como la QS-21, carbómeros como el Carbopol®, entre otros [48]. A pesar de la gran cantidad de vacunas veterinarias en uso, la literatura sobre su evaluación es pequeña en comparación con la del campo de la vacunología humana. Asimismo, los intereses en ambos campos difieren, mientras en la medicina humana la seguridad y respuesta inmune individual del paciente es lo importante, en el ámbito veterinario prevalece la importancia de la protección del grupo, por lo que comúnmente se carece de la información individual [49]. En conjunto, esto dificulta el acceso a información que asocie el uso de adyuvantes en vacunas veterinarias con la inducción de una respuesta inmune específica, lo que repercute en la posibilidad del diseño racional de nuevos adyuvantes dirigidos a la prevención de infecciones veterinarias.

Dado que no existe un adyuvante universal, capaz de inducir una respuesta inmune acorde contra todo tipo de patógenos, la selección apropiada de la combinación de antígenos y adyuvantes se vuelve clave para la formulación de vacunas eficaces [40]. Por este motivo, una vacuna eficaz contra *S. aureus* puede requerir la utilización de un adyuvante distinto a los evaluados hasta el momento, que sea capaz tanto de inducir altos títulos de anticuerpos funcionales, como de estimular la inmunidad mediada por células, en particular los perfiles, Th1 y Th17 [46]. Consecuentemente, existe la necesidad de desarrollar nuevos adyuvantes para ser incorporados en la formulación de candidatos vacunales en la profilaxis de *S. aureus*, que sean seguros, no tóxicos, y capaces de dirigir la respuesta inmune hacia un perfil que brinde protección [32].

Los liposomas como adyuvante

Entre los adyuvantes de nueva generación se encuentran los liposomas, que consisten en vesículas fosfolipídicas capaces de favorecer el desarrollo de respuestas inmunes específicas, principalmente favoreciendo la captura del antígeno y su presentación [50]. Sus principales ventajas como inmunoadyuvantes incluyen: (i) la capacidad de mimetizar patógenos al transportar grandes cantidades de antígenos a las APC, (ii) la posibilidad de co-encapsular antígenos junto con moléculas inmunoestimuladoras, (iii) la flexibilidad en cuanto a la modificación de sus propiedades físico-químicas con el propósito de mejorar su efectividad, y (iv) el hecho de ser biodegradables y no tóxicas [51].

Los liposomas son vesículas formadas por bicapas lipídicas que encapsulan en su interior un medio acuoso (Fig. 4). Si bien los fosfolípidos son la unidad fundamental para su formación, la composición de lípidos puede variar, desde fosfolípidos solos hasta combinaciones con otras moléculas anfipáticas como esteroides o largas cadenas orgánicas básicas o ácidas [52]. Los fosfolípidos presentan un excelente grado de biocompatibilidad, ya que son el componente principal de cualquier membrana celular. A su vez, presentan características como biodegradabilidad, falta de toxicidad y principalmente, capacidad anfipática, la cual permite que

al suspenderse en un exceso de agua espontáneamente den lugar a la formación de bicapas lipídicas concéntricas, separadas por el medio acuoso (Fig. 4) [53–56]. Los liposomas típicamente presentan una estructura esférica cerrada cuyo tamaño puede variar entre 0,025 μm y 2,5 μm . Dependiendo de su tamaño y número de bicapas lipídicas (Fig. 5), los liposomas pueden ser clasificados como vesículas multilaminares (MLV) o unilaminares de gran o pequeño tamaño (LUV o SUV, respectivamente) [52,56]. Asimismo, pueden ser divididos en liposomas catiónicos, aniónicos o neutros según su carga superficial [57]. Estas propiedades dependen de la estructura química de los anfífilos utilizados en la formulación, del buffer en que las vesículas se encuentran suspendidas, así como también del método de preparación empleado [58].

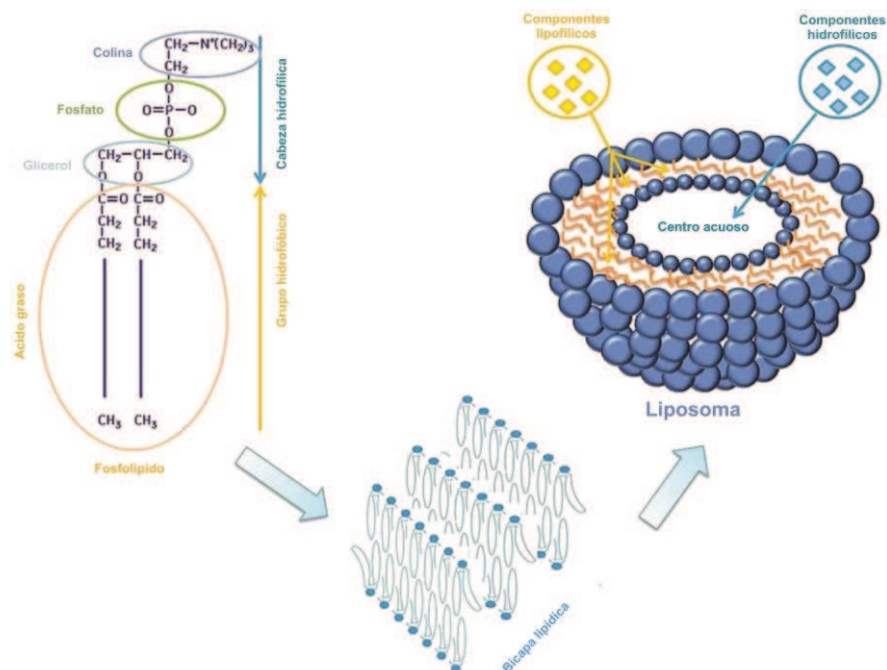


Fig. 4: Representación esquemática de la estructura de un liposoma y del modelo de entrapamiento para componentes lipofílicos e hidrofílicos. Imagen adaptada de [56].

A partir del descubrimiento y caracterización de las estructuras y propiedades de los liposomas, su aplicación se ha vuelto de gran interés en una amplia variedad de áreas, desde la medicina y cosmetología, hasta la industria agroalimentaria, debido a su capacidad única de transportar tanto moléculas hidrofílicas, en la cavidad acuosa, como hidrofóbicas, adsorbidas en las bicapas lipídicas, sin necesidad de someterlas a modificaciones químicas. Esta propiedad única de los liposomas los hace una herramienta altamente versátil, siendo el número creciente de formulaciones liposomales en el mercado, la prueba fehaciente de su enorme potencial [59–61].

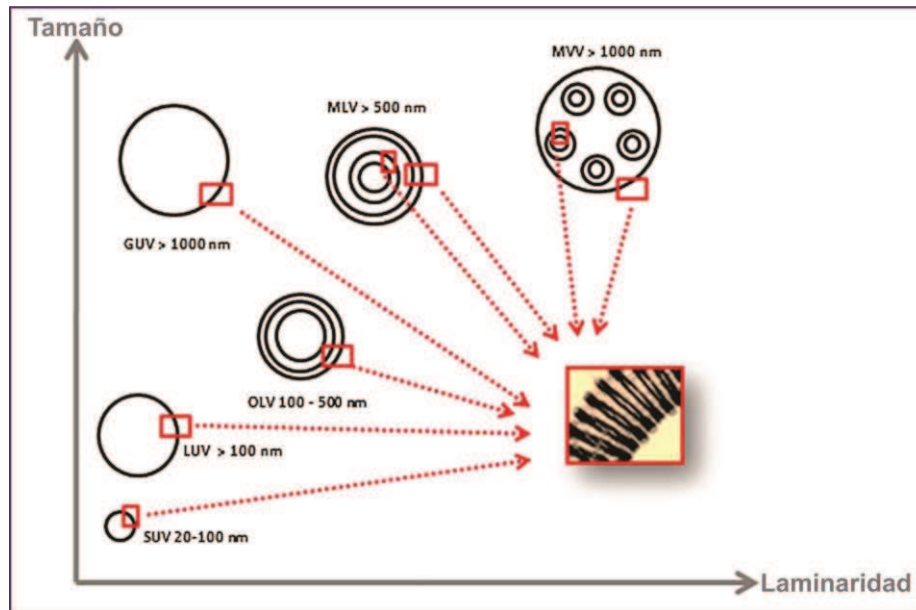


Fig. 5: Clasificación de los liposomas basada en el tamaño y el número de bicapas lipídicas (laminaridad). Dónde: GUV: vesícula unilaminar gigante; LUV: vesícula unilaminar grande; MLV: vesícula multilaminar; MVV: vesícula multivesicular; OLV: vesícula oligolaminar; SUV: vesícula unilaminar pequeña. Imagen adaptada de [56].

Desde la primera vez que se reportó a los liposomas como adyuvantes [62] su formulación ha sido extensamente estudiada para aplicarse como sistema de transporte de antígenos en vacunas. Los liposomas pueden inducir tanto una respuesta inmune humoral como celular hacia antígenos proteicos y polisacáridos. El perfil y potencia de la respuesta inducida dependerá no sólo de las características del antígeno, sino también de las del liposoma empleado [63]. Por lo tanto, mediante la regulación de las propiedades fisicoquímicas de los liposomas es posible maximizar y dirigir la respuesta inmune antígeno específica hacia un perfil de interés. La superficie de los liposomas puede ser fácilmente modificada seleccionando los lípidos apropiados para formar la bicapa, de esta manera se pueden obtener, por ejemplo, variaciones en la carga superficial neta del liposoma, dando lugar a la formación de liposomas catiónicos (carga neta positiva) o aniónicos (carga neta negativa) [53]. Se ha descrito que los liposomas catiónicos, capaces de contener antígenos de manera soluble, inducen una respuesta inmune adaptativa superior a la alcanzada con liposomas neutros que contienen la misma concentración antigénica. Esta diferencia podría deberse a la mayor eficiencia de los liposomas catiónicos para entregar el antígeno en el citoplasma de macrófagos y APC, células con una superficie aniónica [64]. Así también, se ha demostrado que el tamaño de los liposomas catiónicos puede afectar la respuesta inmune celular pero no la humoral. Se ha reportado que liposomas mayores a 2 μm de diámetro inducen de manera efectiva la producción de IL-10, mientras que liposomas de 500 nm promueven la producción de mayores niveles de IFN- γ en esplenocitos. A su vez, se encontró que SUV catiónicas son capaces de inducir una mayor respuesta celular citotóxica que MLV [53]. Si

bien, en general, está claro que las características fisicoquímicas del liposoma pueden influenciar la respuesta inmune, los parámetros ideales para optimizar un adyuvante liposomal a demanda aún no se han podido definir con claridad. Esto, si bien puede justificarse por el gran número de combinaciones de lípidos que pueden ser considerados para la obtención de un liposoma, se debe principalmente a que la capacidad adyuvante de los liposomas es una característica multifactorial y no depende únicamente de su composición, lo que dificulta su comprensión [65].

Por otro lado, la capacidad de los liposomas para co-transportar moléculas, permite incorporar en las formulaciones vacunales moléculas inmunoestimulantes. La elección y la combinación de estos compuestos juegan un papel importante en el control del tipo de respuesta inmune inducida después de la vacunación. La forma en la que el sistema inmune responde suele reflejar el origen de los PAMP utilizados. Así, por ejemplo, los PRR que reconocen ligandos de origen bacteriano a menudo inducen una respuesta Th1, que es adecuada para combatir ciertas infecciones bacterianas. Mientras que el reconocimiento de un ARN bicatenario (ds) derivado de virus dispara una respuesta de linfocitos T citotóxicos (Tc), capaz de combatir una infección viral [64]. Si bien se han desarrollado numerosas formulaciones basadas en este concepto, solo dos adyuvantes liposomales se utilizan actualmente en vacunas autorizadas para el uso en humanos (Tabla 2). Por un lado, los virosomas, que son un tipo de liposoma preparados mediante la combinación de fosfolípidos naturales o sintéticos con el agregado de fosfolípidos de envoltura de virus, glicoproteínas de espículas virales y otras proteínas virales, los que actúan como PAMP. En el caso del virosoma autorizado, este incluye las glicoproteínas virales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de influenza [66]. Por otro lado, se encuentra el adyuvante AS01, basado en liposomas y dos inmunoestimulantes, MPL y QS-21, el primero capaz de ser reconocido y estimular por la vía del TLR-4 y el segundo capaz de estimular el inflamasoma a través de la proteína NLRP3 [43]. Respecto a la utilización de liposomas en el ámbito veterinario, si bien han sido probados en distintos candidatos vacunales, no es de nuestro conocimiento que hayan sido incorporados como adyuvante en vacunas actualmente aprobadas [66].

En nuestro grupo de trabajo se realizó el diseño de un adyuvante basado en liposomas catiónicos, compuestos por dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), colesterol y estearilamina (EA). Las evaluaciones realizadas en ratones BALB/c utilizando un antígeno modelo (albumina sérica bovina) y, añadiendo como inmunoestimulante, oligonucleótidos con motivos CpG (ODN-CpG), mostraron la generación de una respuesta inmune humoral con altos títulos de anticuerpos, con un predominio de la subclase IgG2a respecto a IgG1, estimulación de respuesta celular con producción de IFN- γ y carencia de efectos adversos [67]. Estos resultados conciben con otros autores quienes han reportado que la combinación de liposomas con ODN-CpG permite obtener respuestas más potentes que con ambos adyuvantes por separado y con una marcada tendencia a un perfil Th1 [68].

Frente a estos antecedentes, en la presente tesis se propuso un doble objetivo.

Por un lado, estudiar la respuesta inmune generada en terneras, vaquillonas y vacas preñadas tras la inmunización con una formulación a subunidades, formulada con los adyuvantes liposomales previamente evaluados en ratón por nuestro grupo.

*Por otro lado, generar diversas formulaciones liposomales que contengan distintos inmunoestimulantes junto al antígeno de superficie de *S. aureus*, rClfA y estudiar su capacidad de inducir una respuesta inmune eficiente en un modelo experimental murino. Así también, se evaluó la capacidad de las distintas formulaciones liposomales como vehículo y adyuvante en la administración transdérmica e intradérmica de vacunas.*

*La información obtenida a partir de los diseños realizados y evaluados podrá ser aplicada tanto al diseño de una vacuna para el control de la mastitis bovina causada por *S. aureus*, como también a vacunas orientadas a la profilaxis de enfermedades infecciosas causadas en el Hombre por este patógeno.*

OBJETIVOS

Objetivo General

Diseñar y obtener formulaciones basadas en subunidades para la profilaxis de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* y evaluar la respuesta inmune generada en diferentes modelos animales.

Objetivos Específicos

1. Diseñar y evaluar un esquema de inmunización hacia *S. aureus* en terneras.
2. Evaluar un esquema de inmunización en vaquillonas y vacas preñadas, utilizando la formulación seleccionada con base en los resultados previos.
3. Obtener diversas formulaciones liposomales complementadas con: ODN-CpG, O-palmitoil manano y/o surfactantes aminoacídicos (SAA) de tipo *Gemini*.
4. Evaluar, en un modelo murino, la utilización de las formulaciones obtenidas como adyuvante en vacunas a subunidades contra un antígeno de *S. aureus*.
5. Evaluar la capacidad de las diferentes formulaciones como vehículo de vacunas a subunidades administradas de forma tópica.

CAPÍTULO 1

Prueba de un candidato vacunal en un modelo bovino para el control de la mastitis causada por *S. aureus*.

INTRODUCCIÓN

Mastitis bovina de etiología infecciosa y sus efectos sobre la ubre

La mastitis es definida como la inflamación de la glándula mamaria caracterizada por el movimiento de leucocitos y proteínas séricas de la sangre al sitio afectado, pudiendo tener una etiología infecciosa o no infecciosa. Si bien organismos tan diversos como bacterias, micoplasmas, levaduras y algas han sido implicados como causas de esta enfermedad, la gran mayoría de los casos de mastitis bovina son de origen bacteriano [69,70]. Los microorganismos que con mayor frecuencia causan mastitis se pueden dividir en dos grandes categorías: patógenos contagiosos, que se transmiten de vaca a vaca, principalmente durante el proceso de ordeño, y patógenos ambientales, que se encuentran en todo el hábitat de las vacas lecheras. *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos contagiosos más prevalentemente aislado en los casos de mastitis infecciosas en todo el mundo [71].

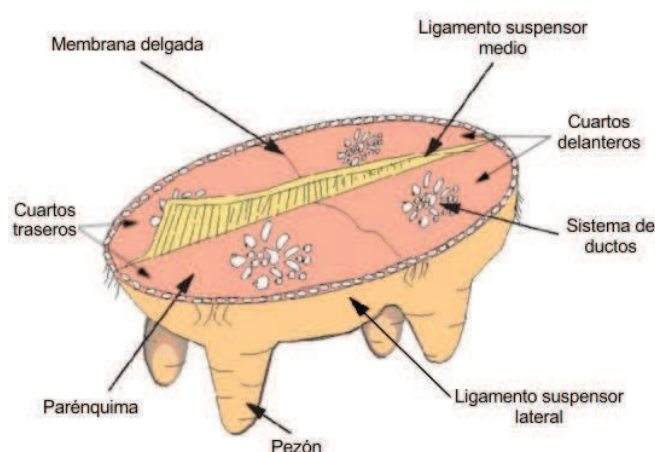


Fig. 6: Representación esquemática de la sección transversal de los cuatro cuartos de la ubre, que ilustra su anatomía macroscópica. Imagen adaptada de [72].

La ubre está conformada por cuatro glándulas mamarias independientes (Fig. 6), denominadas cuartos. Estos cuartos están delimitados por un lado por el ligamento suspensor medio, que actúa como barrera anatómica entre los cuartos derechos e izquierdos, mientras que la separación entre los cuartos delanteros y traseros está dada por la presencia de un tabique delgado de tejido conectivo. A pesar de estas diferencias anatómicas en la separación de los distintos cuartos, no existe conexión directa entre ninguno de ellos, pudiendo así los procesos infecciosos intramamarios ocurrir en un único cuarto. La glándula mamaria madura (Fig. 7) presenta un pezón por cuarto, asociado a un sistema de ductos que permiten el paso de la leche al exterior. Estas estructuras son contenidas dentro del tejido soporte [72]. El parénquima es la

porción de la ubre que se considera funcional y dentro de él se encuentran numerosas unidades productoras de leche, denominadas alvéolos. Los alvéolos son estructuras esféricas de 50 a 250 μm de diámetro, que se componen de células epiteliales secretoras (o células luminales) dispuestas en monocapa, rodeadas externamente por células mioepiteliales (o células musculares lisas). A su vez, cada alvéolo está irrigado por pequeños capilares sanguíneos, que facilitan la llegada de nutrientes y células del sistema inmune. La leche es sintetizada por las células secretoras y depositada en el lumen del alvéolo. Los distintos alvéolos están conectados a un sistema de ductos que conducen la leche a la cisterna de la glándula y, posteriormente, a la cisterna del pezón, dónde se almacena entre los episodios de lactancia u ordeño, debido a que el canal del pezón se encuentra cerrado por la contracción del músculo del esfínter. Tanto los alvéolos como los conductos y cisternas de toda la glándula están cubiertos por células mioepiteliales, que, por su naturaleza contráctil regulada por la oxitocina y el estímulo mecánico, facilitan el proceso de eyección de la leche [73].

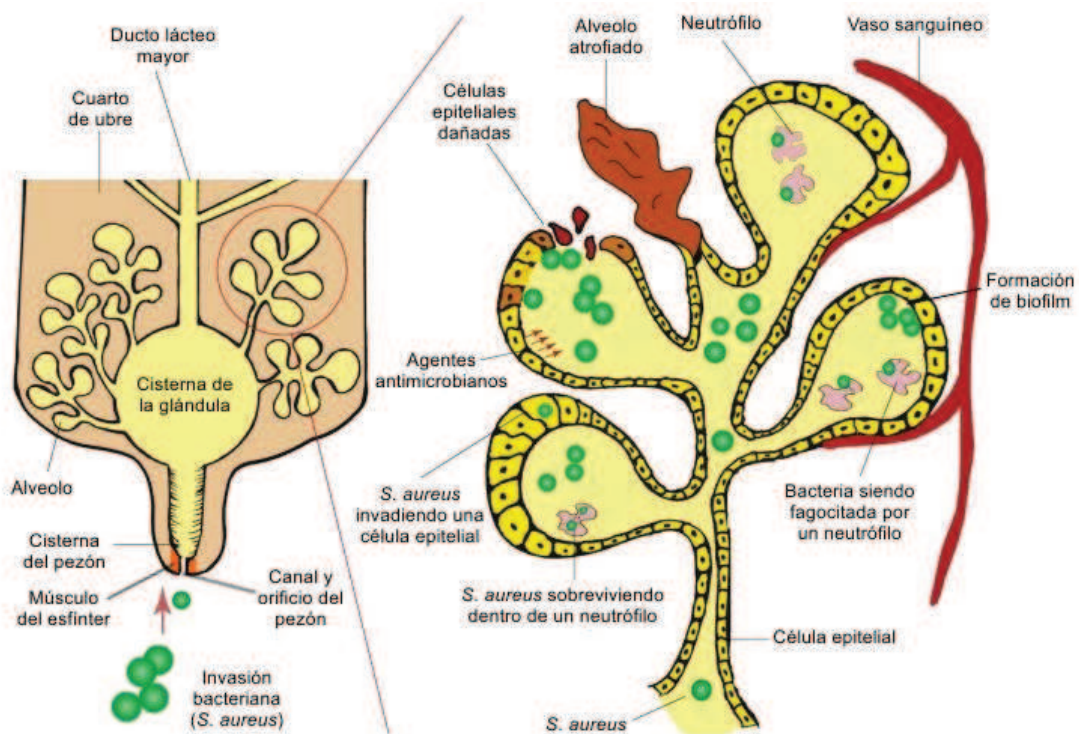


Fig. 7: Representación esquemática del desarrollo de una mastitis en un cuarto infectado. Microorganismos como el *S. aureus* invaden la ubre a través de la cisterna del pezón. Posteriormente, se multiplican dentro del cuarto infectado, pudiendo dañar las células epiteliales que recubren los alvéolos. Como respuesta, se produce una gran infiltración de neutrófilos que atacan y fagocitan a las bacterias, así como de otras células inmunes, en un intento por controlar la infección. Asimismo, las células epiteliales, en contacto con el lumen de la glándula mamaria, secretan compuestos antimicrobianos. Una vez que las células inmunes efectoras comienzan a combatir al patógeno, se observa un daño considerable en el tejido, como la presencia de alvéolos atrofiados. Imagen adaptada de [74].

La mastitis es causada cuando las bacterias patógenas ingresan al ambiente estéril de la glándula mamaria (Fig. 7). Normalmente, el canal del pezón está bien cerrado por los músculos del esfínter, evitando la entrada de patógenos. A su vez, el canal está recubierto con queratina, un material ceroso derivado del epitelio escamoso estratificado que obstruye la migración de bacterias y contiene agentes antimicrobianos. Sin embargo, durante el ordeño se producen dos efectos que aumentan la vulnerabilidad de la glándula mamaria, por un lado, el tapón de queratina es expulsado, y por otro, aumenta la distensión del canal del pezón. Posterior a cada evento de lactancia u ordeño, el esfínter requiere aproximadamente 2 horas para volver a la posición contraída, dejando el canal abierto para el ingreso de bacterias [74].

Una vez dentro del pezón, si la infección se instaura, las bacterias comienzan a multiplicarse dentro de la glándula mamaria, liberando, a su vez, toxinas que inducen a leucocitos y células epiteliales a liberar moléculas quimioattractantes. Esto atrae a células efectoras del sistema inmune, principalmente neutrófilos, al sitio de infección. Los neutrófilos contienen gránulos intracelulares que almacenan péptidos bactericidas, proteínas, enzimas y proteasas, y actúan por diversos mecanismos para combatir la infección, como la liberación del contenido sus gránulos, la fagocitosis, e incluso la netosis [74,75]. Los compuestos liberados por los neutrófilos no sólo destruyen las bacterias, sino que también pueden dañar las células epiteliales [74,76]. El daño del tejido generado por la respuesta inmune, sumado al daño producido por las toxinas secretadas por algunas bacterias, como *S. aureus*, pueden producir la fibrosis del tejido epitelial, lo que resulta en una pérdida parcial o completa de la producción de leche [73,74]. Los neutrófilos, después de llevar a cabo el proceso de fagocitosis, sufren un proceso de apoptosis constitutiva. Los neutrófilos apoptóticos son reconocidos por los macrófagos residentes, quienes los eliminan del sitio de inflamación, previniendo el daño tisular al inhibir la liberación de su contenido [75]. Las células epiteliales mamarias muertas y desprendidas, además de los leucocitos muertos, se secretan en la leche, lo que produce un aumento en el recuento de células somáticas (RCS) en leche [74].

Como mecanismo de evasión de la respuesta inmune, *S. aureus* es capaz de sobrevivir dentro de neutrófilos y células epiteliales, logrando que la infección persista [77]. Si esto ocurre, puede producirse una inflamación interna dentro del epitelio mamario, que normalmente no puede detectarse mediante un examen externo. Los alvéolos de la glándula mamaria se dañan y comienzan a perder integridad anatómica (Fig. 7). La barrera sangre/leche se rompe y hace que los componentes del fluido extracelular entren en la glándula y se mezclen con la leche, incluso cuando se ha producido un daño extenso en la barrera, se puede llegar a detectar sangre. Esto conduce a cambios visibles en la ubre, como una mayor inflamación externa y enrojecimiento de la glándula. Por otro lado, se producen cambios en la calidad de la leche, caracterizados por la disminución en la concentración de lactosa y caseína, cambios en la conductividad debido a la variación en la concentración de minerales como los iones cloruro, sodio y potasio, variaciones

en el contenido de agua, así como el aumento del RCS, la presencia de coágulos y escamas visibles. Esto marca la etapa inicial de los síntomas clínicos, pudiendo llegar incluso, en las infecciones más graves, hasta la muerte del animal [74,78].

Efectos de la mastitis bovina en la rentabilidad del tambo

La mastitis bovina es uno de los principales factores limitantes de la rentabilidad de la producción lechera en el mundo, ocasionando grandes pérdidas económicas. Los costos relacionados con las infecciones intramamarias pueden dividirse entre: aquellos asociados con el tratamiento de la infección, los derivados del aumento de la mortalidad debido al sacrificio prematuro de animales y su reemplazo, y los costos indirectos asociados a la disminución de la producción y deterioro de la calidad de leche [79].

Si bien a nivel mundial se han realizado numerosos estudios sobre los efectos económicos asociados a los casos de mastitis bovina y su control, existen varias discrepancias en cuanto a las pérdidas estimadas en estos reportes. Estas diferencias pueden ser adjudicadas a numerosas variables, que van desde factores propios del tambo, como la incidencia de casos de mastitis y el tratamiento aplicado en cada uno de ellos, hasta cuestiones metodológicas como el cálculo de los costos y beneficios, basados en datos provenientes de diferentes fuentes, regiones, y/o diferentes niveles (cuarto, animal, granja y región). Asimismo, a pesar del hecho de que la mastitis puede ser causada por diferentes patógenos capaces de generar distintos grados de daño en la ubre, son pocos los estudios sobre el efecto económico que incluyen este factor [79].

En Argentina, un estudio realizado en el año 2015 sobre rodeos ubicados en la Cuenca Central de Córdoba, estimó una pérdida directa diaria de 0,99 dólares/vaca/día. Adicionalmente, estos autores reportaron que el 50% de los establecimientos tenían un costo total superior a 1 dólar/vaca/día, incluyendo en este cálculo tanto las pérdidas asociadas directamente a la producción de leche, como los gastos asociados al control y prevención de los casos de mastitis. Así, el costo total de la mastitis en esta región representa, en promedio, el 16% de los ingresos brutos diarios en al menos la mitad de los establecimientos [80].

Prevención y tratamiento de los casos de mastitis

Existe un conjunto de medidas para la prevención y el control de los casos de mastitis, denominado “Programa de los 10 puntos” (*10-Point Program*), el cual fue redactado por el *National Mastitis Council* e implementado en numerosos países [81]. Este programa cuenta con una guía que establece las pautas que deberían implementarse en cualquier tambo.

Los 10 puntos incorporados son:

1. Delineamiento de los objetivos a cumplir respecto al estado de salud de las ubres.
Este punto incluye, por ej. la determinación del RCS aceptable.
2. Manejo adecuado del ambiente, el cual debe permanecer limpio, seco y confortable.

3. Procedimientos adecuados de ordeño. Este punto busca asegurar la higiene a lo largo de todo el proceso e incluye la desinfección y sellado post ordeño de los pezones.
4. Mantenimiento y uso adecuado del equipo de ordeño.
5. Registro de datos adecuado. Deben incluirse todos los datos asociados al animal que presente el caso de mastitis; identificación, cuarto afectado, agente causal, entre otros.
6. Manejo apropiado de las mastitis clínicas durante la lactancia. En este punto se debe considerar el estudio de los casos de mastitis para la selección de una terapia antimicrobiana apropiada.
7. Manejo adecuado y eficaz de las vacas secas. Este punto incluye, entre otras, consideraciones respecto a la nutrición adecuada en este periodo y a la terapia antibiótica aplicada al secado.
8. Implementación de medidas de bioseguridad contra los patógenos contagiosos y descarte de las vacas con mastitis crónicas.
9. Monitoreo regular del estado de salud de las ubres.
10. Revisión periódica de las prácticas de control de mastitis.

En Argentina, en la última década, se crearon distintos programas nacionales que han tenido como finalidad el delineamiento de estándares y medidas que aseguren la obtención de productos de alta calidad láctea. Dentro de las medidas gubernamentales más recientes, se encuentra la creación de la Dirección Nacional Láctea en el año 2018, ahora dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. En 2019, se creó el programa de Buenas Prácticas Lechera, controlado por esta Dirección, que daría lugar a un material de referencia elaborado en conjunto con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), denominado “Guía de buenas prácticas para establecimientos lecheros” [82]. Asimismo, en este marco, desde la página web de la Dirección Nacional Láctea, se fomenta la realización de un curso en línea gratuito para la mejor comprensión de los conceptos desarrollados en este material. La “Guía de buenas prácticas para establecimientos lecheros” incluye un plan de control y prevención de mastitis desarrollado en concordancia con el “Programa de los 10 puntos” del National Mastitis Council [82]. Sin embargo, a pesar de conocerse las herramientas claves para el control de las mastitis, impulsada tanto por este programa, como por sus predecesores, un estudio realizado en Argentina en el año 2015, asoció las pérdidas económicas del tambo, principalmente, con las mastitis subclínicas. La incidencia de este tipo de mastitis podría estar ligada al grado de aplicación de las medidas de control y prevención. En relación a esto, observaron que casi un 20% de los productores solo utilizaba como medida de control el tratamiento de casos de mastitis clínicas y alrededor del 60% no contemplaba la aplicación de desinfección post ordeño de pezones, medida profiláctica de conocida eficacia en la reducción de los niveles de mastitis [80].

Resumidamente, a nivel mundial las medidas de prevención y tratamiento de los casos de mastitis, causadas tanto por *S. aureus* como por otros agentes, están basadas en higiene y terapia antibiótica. Como se pudo observar, estas medidas no siempre son correctamente aplicadas, lo que deriva en un control incorrecto de los casos de mastitis y grandes pérdidas económicas. Asimismo, el uso inadecuado o desmedido de antibióticos en la producción lechera y cárnica representa una gran preocupación para la salud pública, debido al posible surgimiento de patógenos zoonóticos resistentes. Si bien se utilizan diferentes clases de antibióticos en el manejo de la salud animal y en la medicina humana, la selección de resistencia a una clase de drogas puede conducir al surgimiento de resistencia cruzada con otra [83]. En particular, *S. aureus* ha demostrado poseer una gran facilidad para obtener resistencia a los antibióticos, resultando en casos de infecciones intramamarias crónicas que resultan en la eliminación del animal. Esto, sumado a su notoria capacidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos comúnmente utilizados en medicina humana, como la metilina y la vancomicina, y el surgimiento de cepas multirresistentes, colocan al uso de antibióticos en la producción lechera en el centro de atención de organismos de salud pública [84]. A diferencia de la transmisión zoonótica de cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina a partir de cerdos y comprobada por distintos autores, no hay un consenso respecto a la transmisión de cepas bovinas a humanos [85]. Algunos autores han concluido que la transferencia zoonótica de cepas de *S. aureus*, asociadas con infecciones intramamarias en el ganado, parece ser muy limitada y que los diferentes huéspedes no se consideran una fuente de infecciones mutuas espontáneas [86]. Sin embargo, otros autores sugieren que las cepas bovinas tienen un gran potencial para convertirse en infectivas para humanos [87].

Considerando lo antes desarrollado y la alta prevalencia de *S. aureus* en la naturaleza, se genera la necesidad de desarrollar una vacuna capaz de controlar y prevenir las enfermedades infecciosas causadas por este patógeno.

Vacunas disponibles y su capacidad protectora

Si bien diversos grupos de investigación han desarrollado una variedad de inmunógenos experimentales contra *S. aureus* tanto en el campo medicinal como veterinario, ninguno de ellos ha resultado completamente eficaz en prevenir la infección por este microorganismo. Por este motivo, solo dos vacunas específicas contra *S. aureus* constituidas por lisados bacterianos o células enteras, se encuentran disponibles comercialmente y autorizadas para uso exclusivamente veterinario, en la prevención de la mastitis bovina [2,88–90].

La primera vacuna fue desarrollada y comercializada en EE.UU. desde la década del 70. Lleva el nombre comercial Lysigin® (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., St Joseph, MO, USA) y está compuesta por un lisado de 5 cepas, incluyendo los serotipos capsulares CP5, CP8 y SP336, formulado con un adyuvante basado en el hidróxido de aluminio [91]. Se han informado

resultados contradictorios con respecto a la eficacia de esta vacuna. En un estudio de eficacia realizado por Nickerson y col., los autores inmunizaron un conjunto de terneras, siguiendo el esquema sugerido por el fabricante, a los 6 meses de edad, aplicando una segunda dosis 2 semanas más tarde y refuerzos sucesivos cada 6 meses hasta el parto. Respecto al grupo control sin vacunar, los animales vacunados presentaron una reducción del 45%, en el número de casos de nuevas infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* durante la preñez y el parto. Además, en relación a los casos de infecciones que se volvieron crónicas, los animales vacunados presentaron una reducción del 30% respecto al grupo control [92]. En estudios posteriores realizados en vaquillonas primíparas, la eficacia de la vacuna Lysigin® fue comparada contra dos formulaciones experimentales que contenían, respectivamente, 3 y 5 cepas de las incluidas en la vacuna comercial y un grupo control sin vacunar. Los animales recibieron 2 dosis, distanciadas 28 días, durante la etapa tardía de gestación y fueron desafiados con una cepa heteróloga de *S. aureus* por vía intramamaria, en los días 6 a 8 de comenzada la lactancia, en un único cuarto. Todos los animales se infectaron luego del desafío y no se observaron diferencias en la tasa de eliminación (o *clearance*) de *S. aureus* entre los grupos. A su vez, después del desafío, en ninguno de los grupos vacunados se observó un RCS más bajo o que presentaran una mayor producción de leche que el grupo control. Sin embargo, si bien las distintas vacunas no fueron capaces de prevenir el desarrollo de nuevas infecciones intramamarias, las vaquillonas inmunizadas con Lysigin® presentaron una menor severidad y duración de las mastitis clínicas respecto a los controles [93]. Posteriormente, se estudió la respuesta humoral inducida por esta vacuna en vaquillonas preñadas. Los animales inmunizados presentaron, en sangre, niveles de IgG1 e IgG2 específicos contra los 3 serotipos de *S. aureus* incorporados significativamente mayores a los alcanzados por el grupo control. Sin embargo, en leche, sólo se detectó un aumento en los niveles de IgG anti-*S. aureus* CP8 y SP336 [94]. Seguidamente, el mismo grupo realizó un ensayo a campo en el que inmunizaron vacas en lactancia con dos dosis subcutáneas de Lysigin® distanciadas en 14 días, tiempo entre dosis recomendado por el fabricante, y observaron la aparición de infecciones intramamarias naturales causadas por *S. aureus*. Los resultados demostraron que este esquema de administración no reduciría la incidencia de nuevas infecciones. Además, tampoco pudieron detectar diferencias en los niveles de IgA, IgG1, IgG2 e IgM en leche, entre los animales vacunados y los controles sin inmunizar. Basándose en este conjunto de datos, los autores sugieren que los niveles de anticuerpos opsonizantes inducidos por la vacuna en leche, serían insuficientes para facilitar la fagocitosis y la eliminación de *S. aureus* de la glándula mamaria [88]. A su vez, estos resultados sumados a los obtenidos por otros autores que repitieron el esquema implementado por Nickerson y col. en 1999, demuestran que sería clave el comienzo temprano del plan de inmunización, así como la administración repetida de distintos refuerzos, para mantener niveles adecuados de anticuerpos circulantes capaces de colaborar con la eliminación de la infección [91].

Otra vacuna disponible comercialmente es STARTVAC[®], la cual fue lanzada en el año 2009 por LABORATORIOS HIPRA, S.A., Girona, España. Esta vacuna contiene la cepa de *Escherichia coli* J5 inactivada y la cepa de *S. aureus* (CP8) SP 140 inactivada, que expresa el Complejo Antigénico Asociado a Exopolisacárido (SAAC, por sus siglas en inglés), formuladas con un adyuvante oleoso. La eficacia de esta vacuna ha sido evaluada por distintos autores que han llegado a resultados contradictorios. Por un lado, en un ensayo se estudió la capacidad de esta vacuna para reducir o prevenir la aparición de nuevos casos de mastitis causados por *S. aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativos. Para esto, vacas y vaquillonas pertenecientes a dos establecimientos lecheros, fueron inmunizadas siguiendo el esquema de vacunación indicado por el fabricante: una primera dosis se suministró 45 días previos a la fecha estimada de parto, una segunda dosis 10 días previos al parto y una tercera transcurridos 52 días de lactancia. Los animales fueron monitoreados durante 21 meses, observándose una reducción moderada de la incidencia de nuevos casos de mastitis asociados a estos patógenos, y una menor duración de estas infecciones en los animales vacunados respecto de los controles sin vacunar. A su vez, los autores detectaron que la eficacia dependía del grupo etario de los animales, en particular para *S. aureus*, siendo mayor la protección en los animales en primera lactancia respecto a aquellos en tercera lactancia o posteriores [95]. Sin embargo, en un estudio similar realizado en dos establecimientos suecos con problemas previos de mastitis causados por *S. aureus*, la vacunación no representó ninguna mejora respecto a la salud de las ubres, la producción láctea o la supervivencia de los animales [96]. Resultados semejantes se obtuvieron en un ensayo realizado en Alemania, donde la vacunación con STARTVAC[®] en un rodeo lechero no demostró consistencia en la mejora de los parámetros de salud mamaria [97]. En otro estudio realizado en 7 establecimientos lecheros de Reino Unido, la administración de STARTVAC[®] siguiendo el régimen sugerido por el fabricante no se asoció con una disminución en la incidencia de casos de mastitis clínica o subclínica en los primeros 120 días de lactancia. Sin embargo, las vacas vacunadas fueron significativamente menos propensas a experimentar mastitis clínicas severas y produjeron significativamente más leche que los controles no vacunados [98]. Otros autores evaluaron el efecto de la inmunización con STARTVAC[®] en vacas y vaquillonas, sobre la respuesta inmune desarrollada luego del desafío experimental intramamario con una cepa de *S. aureus* heteróloga inactivada. La respuesta inmune inducida por la vacunación contra *S. aureus* estaría asociada a una fuerte respuesta de tipo Th2, caracterizada por la presencia, principalmente, de anticuerpos del subtipo IgG1 en suero. En este ensayo, también detectaron un aumento de la concentración de anticuerpos específicos contra SAAC en el suero de leche de los animales vacunados respecto a los no vacunados [99]. Esto podría estar relacionado a una mayor eficiencia en la opsonización de la bacteria *S. aureus*, y por consiguiente a la disminución de los casos clínicos severos o los tiempos de infección como reportan otros autores.

Las vacunas a subunidades como opción para mejorar la capacidad protectora

Las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* son principalmente de tipo subclínicas, por lo tanto, una vacuna eficaz debería reducir la tasa de infección. Las vacunas disponibles en el mercado pueden reducir la gravedad de las mastitis clínicas, pero parecen ser incapaces de prevenir nuevas infecciones. La consecuencia práctica de esto es que, hasta la fecha, las vacunas no proporcionan una protección totalmente efectiva contra los casos de mastitis causados por este patógeno. Las razones por las que se han obtenido estos resultados relativamente pobres son diferentes y están relacionadas tanto con las bacterias como con el huésped [100].

En el caso de las limitaciones asociadas al patógeno, en gran medida, se encuentran asociadas a la gran variabilidad genética observada en *S. aureus*. Asimismo, se conoce que esta bacteria es capaz de expresar distintos antígenos durante diferentes fases de crecimiento. La regulación de la expresión de estos factores de virulencia, se lleva a cabo por el sistema de percepción de quórum denominado sistema *agr* (*accessory gene regulator*). Durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria, este sistema es el responsable del descenso en la transcripción de genes que codifican algunas proteínas de superficie, induciendo en simultáneo un aumento en la expresión de ciertas toxinas extracelulares [101]. Debido a esto, existe un acuerdo generalizado entre los autores que han trabajado en el desarrollo de inmunógenos para el control de la infección intramamarias por *S. aureus*, sobre la necesidad de combinar antígenos en vacunas multivalentes, para generar respuestas inmunes capaces de intervenir en las distintas etapas de la patogénesis estafilocócica [102]. Si bien la estrategia de preparación de inmunógenos a partir de bacterinas o lisados de *S. aureus* suplementados con toxoides inactivados, productos capsulares o productos bacterianos extracelulares fue utilizada desde épocas tempranas, los componentes de varias de las formulaciones evaluadas no fueron exactamente caracterizados. A su vez, existen pocos antecedentes sobre el uso de inmunógenos multicomponentes compuestos por antígenos definidos destinados al control de casos de mastitis causados por *S. aureus* y evaluados en modelos bovinos [16]. Existe una falta de consenso general sobre cuáles serían los antígenos ideales a incluir en una vacuna multivalente, por lo que su elección representa uno de los mayores desafíos, considerando que una selección inadecuada puede afectar significativamente la eficacia de la vacunación [100].

Otro de los motivos propuestos por los cuales los inmunógenos evaluados hasta el momento no han resultado completamente eficaces, es que una protección adecuada no se lograría solamente con la estimulación de una respuesta inmune humoral, sino que también debería estar acompañada de una respuesta local mediada por células [102]. La estimulación de linfocitos T capaces de producir IFN- γ en respuesta al encuentro con el patógeno ha sido propuesta como una de las claves para la erradicación de los estafilococos intracelulares a través de la activación de células fagocíticas [103]. Por otro lado, en ensayos de inmunización y desafío realizados en

modelo murino de mastitis, se observó una relación significativa entre la presencia de linfocitos T CD8+ y la disminución en los recuentos de bacterias recuperadas luego de la infección, lo que llevó a sugerir que la inducción de respuestas citotóxicas sería una estrategia prometedora en el diseño de vacunas contra mastitis estafilocócicas [104]. Otros autores sugieren que la vía de administración del inmunógeno, así como el adyuvante utilizado para la formulación deberían inducir la producción de anticuerpos con capacidad opsónica, y el reclutamiento de neutrófilos activados [105]. Cabe destacar que la respuesta inmune requerida para el control de la mastitis bovina causada por *S. aureus* sería semejante a la requerida en el control de infecciones cutáneas y de tejidos blandos en el hombre, requiriendo ambas también de la activación del perfil Th17 [106,107].

Ante estos antecedentes, una vacuna a subunidades que combine componentes bacterianos que cumplan un rol determinante en distintas etapas de la infección como en la evasión del sistema inmune, formulada con un adyuvante capaz de generar una respuesta inmune humoral y celular balanceada, podría ser la clave para la obtención de una mayor eficacia. Asimismo, la inclusión de inmunopotenciadores capaces de desencadenar respuestas inmunes innatas tempranas que colaboren en la generación de respuestas inmunes adaptativas robustas y duraderas podría ser crucial para obtener una vacuna capaz de reducir la tasa de nuevas infecciones.

La importancia del calendario de vacunación

La mastitis bovina fue identificada como una patología de alta incidencia en el ganado lechero hace más de 75 años. En un principio, se creyó que las infecciones intramamarias ocurrían cuando el animal atravesaba las etapas de gestación tardía, parto o lactancia temprana. Sin embargo, posteriormente se demostró una alta prevalencia de infecciones intramamarias en vaquillonas, incluso previo a realizarse su primera inseminación. Así, por ejemplo, un trabajo realizado en los 90, detectó que un 86,7% de los cuartos de vaquillonas no inseminadas se encontraban infectados. En este estudio, *S. aureus* fue uno de los tres patógenos más comúnmente aislados tanto en vaquillonas no inseminadas como preñadas. Estos resultados, demostraron que la infección de las glándulas mamarias por patógenos como *S. aureus* puede ocurrir a una edad muy temprana, pudiendo perjudicar el crecimiento y desarrollo mamario e influir en la futura producción lechera [108]. Asimismo, se conoce que la mayoría del ganado lechero tiene inmunidad preexistente contra *S. aureus* al primer parto, demostrado por los altos títulos de anticuerpos específicos contra *S. aureus* y varias de sus proteínas de evasión encontrados en estos animales. Esto puede deberse a la exposición natural a este patógeno durante su desarrollo mediante, por ejemplo, colonizaciones transitorias de distintos epitelios. A pesar de esto, esa respuesta inmune generada contra *S. aureus* parece no ser protectora, ya que la infección por este patógeno no protege contra infecciones posteriores. Por lo tanto, la vacunación de animales ya

expuestos a *S. aureus* puede conducir la activación de una respuesta inmune preexistente no protectora, en lugar de dar lugar a la inducción de una respuesta inmune protectora [109].

A pesar de esta evidencia, las vacunas disponibles comercialmente para la prevención de la mastitis bovina, cuentan con dos calendarios de vacunación muy distintos. Por un lado, y en concordancia con lo antes expuesto, Lysigin® aconseja la inmunización de los animales con dos dosis a los 6 meses de edad siguiendo con un programa de refuerzos cada 6 meses. Por su lado, STARTVAC® recomienda la aplicación de dos dosis previas al parto a los 45 y 10 días previos de la fecha estimada y un refuerzo a los 52 días de comenzada la lactancia. Sin embargo, cabe recordar que sólo el ensayo experimental donde se probó la vacuna Lysigin® siguiendo las recomendaciones del fabricante demostró una disminución en la aparición de nuevas infecciones [92], dejando entrever la importancia del comienzo de un plan de inmunización desde edades tempranas.

En nuestro grupo de trabajo, se ha evaluado, previamente, un inmunógeno compuesto por células lisadas de *S. aureus*, suplementado con antígenos recombinantes considerados relevantes en la infección estafilocócica, y formulado con Iscom Matrix™. Esta formulación indujo la producción de anticuerpos específicos en sangre y leche, los cuales resultaron eficientes en la opsonización del microorganismo, y en la neutralización de sus factores de virulencia *in vitro* [28]. Sin embargo, este inmunógeno, como la mayoría de los previamente evaluados [102], se administró en el último tercio de la gestación de vaquillonas primíparas, resultando de gran interés su evaluación de un plan de inmunización en terneras.

*Para el desarrollo de este capítulo, se sostuvo como hipótesis que una vacuna que incluya múltiples antígenos, formulados con un adyuvante adecuado, permitiría la generación de una respuesta inmune beneficiosa contra componentes que cumplan un rol determinante en distintas etapas de la infección por *S. aureus*. A su vez, se consideró que, para lograr una disminución de la incidencia de nuevas infecciones intramamarias, así como una atenuación de los efectos patogénicos que tienen lugar durante la misma, es clave la selección de un plan de inmunización adecuado.*

Frente a esta hipótesis, se decidió evaluar la respuesta inmune generada en terneras tras la inmunización con una formulación a subunidades. Para ello, se diseñó un inmunógeno prototípico que incluyó los antígenos recombinantes FnBPA (rFnBPA) y ClfA (rClfA), formulado con los adyuvantes previamente evaluados por nuestro grupo en un modelo murino. Los animales incluidos en este ensayo fueron estudiados durante dos años, periodo en el que recibieron dos refuerzos. Uno de estos refuerzos se realizó previo a su primer parto, lo que permitió estudiar los efectos del plan de inmunización en la respuesta inmune humoral cuando el animal presenta una mayor susceptibilidad a contraer una infección intramamaria.

Con base en estos resultados, se seleccionó el adyuvante que demostró mejoras significativas en la respuesta inmune y se lo evaluó en conjunto con un inmunógeno multicomponente compuesto por los antígenos recombinantes rClfA, rFnBPA, r α -toxina y r β -toxina, en un esquema de inmunización comenzado en la etapa tardía de gestación, en vaquillonas y vacas preñadas.

OBJETIVOS

Objetivos específicos tratados en el presente capítulo:

1. Diseñar y evaluar un esquema de inmunización hacia *S. aureus* en terneras.
 - 1.1. Diseñar una formulación combinada que contenga los antígenos recombinantes FnBPA (rFnBPA) y ClfA (rClfA) de *S. aureus* y un adyuvante basado en liposomas.
 - 1.2. Realizar un plan de inmunización en terneras.
 - 1.3. Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por la formulación.
2. Evaluar un esquema de inmunización en vaquillonas y vacas preñadas, utilizando la formulación seleccionada con base en los resultados previos.
 - 2.1. Obtener la formulación elegida incluyendo los antígenos recombinantes rFnBPA, rClfA, r α -toxina y r β -toxina de *S. aureus*.
 - 2.2. Realizar un esquema de inmunización en vaquillonas y vacas de primer parto.
 - 2.3. Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por la formulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseñar y evaluar un esquema de inmunización hacia *S. aureus* en terneras.

1.1. Diseñar una formulación combinada que contenga los antígenos rFnBPA y rClfA de *S. aureus* y un adyuvante basado en liposomas.

1.1.1. Composición del inmunógeno experimental: Se obtuvieron los antígenos recombinantes rFnBPA y rClfA, por inducción de la expresión en *Escherichia coli*, a partir de clones previamente disponibles en el laboratorio [28,110]. El inmunógeno experimental consistió en una mezcla de 100 µg/dosis de cada uno de los antígenos recombinantes [28].

1.1.2. Formulación de los inmunógenos experimentales: A los efectos de evaluar la capacidad adyuvante de las formulaciones liposomales, en bovinos, se prepararon tres sistemas adyuvantes diferentes. Por un lado, se obtuvieron liposomas (Lip) utilizando DPPC, colesterol y EA por el método de inyección etanólica. Los tres componentes, en proporción 7:2:2 mol/mol, se disolvieron en una mezcla de etanol/isopropanol (1:1 v/v), esta mezcla se denominó fase orgánica. Por otro lado, se obtuvo una fase acuosa formada por buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,3, que alternativamente pudo contener o no los antígenos evaluados. La fase orgánica fue incorporada por inyección a la fase acuosa en proporción 1:9 v/v [67,111,112]. La segunda formulación consistió en liposomas suplementados con ODN-CpG. Para esto, a la preparación de liposomas se le agregaron oligonucleótidos con la secuencia: 5'-tcgtcgtttgctgtttgctgtt-3', que han demostrado ser inmunomoduladores en bovinos [113]. Las concentraciones finales de cada componente en las formulaciones resultaron: Lip 4mM, rFnBPA 100 µg/ml, rClfA 100 µg/ml, ODN-CpG 7,5 ng/ml. La tercera formulación fue preparada utilizando 15% de Al(OH)₃ (Alhydrogel™) como control de la respuesta inmune mediada por un adyuvante comercial autorizado.

1.2. Realizar un plan de inmunización en terneras.

1.2.1. Animales experimentales y cronograma de vacunación: Se seleccionaron 53 terneras de 6 a 8 meses de edad, pertenecientes al tambo de la Estación Experimental INTA Rafaela (Santa Fe, Argentina). Antes de comenzar con el esquema de vacunación, se tomaron muestras de sangre por punción en la vena yugular y se determinó por medio de técnica de ELISA la presencia de anticuerpos anti-*S. aureus* en sangre [92]. Cuarenta y cuatro animales libres de anticuerpos anti-*S. aureus* fueron finalmente incluidos en el experimento y fueron divididos al azar

en seis grupos. Cuatro de ellos recibieron los antígenos incorporados en las siguientes formulaciones: Lip+rFnBPA/rClfA (n=8); Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA (n=8); ODN-CpG+rFnBPA/rClfA (n=7) e Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA (n=7); mientras que los 2 grupos control recibieron: Lip+ODN-CpG (n=7) e Al(OH)₃ (n=7). Se administraron 3 dosis por vía subcutánea en la tabla del cuello, a los 0, 15 y 45 días. Pasado un año de la última dosis, se administró una cuarta dosis para verificar la posibilidad de activar una respuesta inmune de memoria. El día 21 previo a la fecha estimada de parto de cada animal (aproximadamente 18 meses desde el comienzo del plan de inoculación), se administró un refuerzo por vía subcutánea en el área supramamaria.

1.2.2. *Procedimientos de muestreo*: Se tomaron muestras de sangre por punción de la vena yugular de todos los animales cada 15 días desde el día 0 al día 75 de comenzado el plan y a los 0, 15 y 60 días de la cuarta dosis. Así también se tomaron 4 muestras adicionales, cada 15 días, a partir de la administración del refuerzo pre-parto. Por otro lado, en estos mismos tiempos y una vez ocurrido el parto, se tomaron muestras de leche de cada cuarto de manera aséptica. Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y luego se centrifugaron para la obtención del suero. Por otro lado, se generaron muestras compuestas de leche tomando 500 µL de leche de cada cuarto. Las muestras de leche fueron centrifugadas y el sobrenadante obtenido fue separado. Alternativamente, una fracción de cada muestra compuesta fue acidificada y centrifugada para la obtención del suero de leche. Todas las muestras obtenidas fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

1.3. Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por la formulación.

1.3.1. *Determinación de anticuerpos específicos*: La producción de anticuerpos (IgG, IgG1 e IgG2) específicos para rFnBPA y rClfA fue determinada mediante ELISA indirecto. Placas de poliestireno de 96 pocillos (GBO, Frickenhausen, DEU) fueron sensibilizadas con 0,5 µg/pocillo de rFnBPA o rClfA. Los sueros fueron analizados en una dilución 1/1000 y los sueros de leche en 1/100. La unión de los anticuerpos se evaluó mediante incubación con los anticuerpos anti-IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y anti-IgG1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bovino conjugados a peroxidasa o anti-IgG2 bovino no conjugado hecho en ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) seguido de la incubación con un anticuerpo anti-IgG murino conjugado a peroxidasa (Jackson, Baltimore, MD, USA). El revelado se realizó mediante la utilización de una solución de TMB (*ready-to-use*, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y la reacción de color se detuvo con H₂SO₄

2N. La densidad óptica se midió a 450 nm usando un lector de microplacas (Multiskan EX, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA).

1.3.2. Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos: Para evaluar la capacidad de los anticuerpos, generados tras la inmunización con las formulaciones experimentales, de reconocer cepas de *S. aureus*, se evaluó la capacidad de los anticuerpos de bloquear la unión de *S. aureus* Reynolds a fibrinógeno (Fb).

i. Purificación de anticuerpos específicos: Cada suero obtenido a los 15 días del refuerzo pre-parto fue incubado en contacto con una membrana de nitrocelulosa previamente sensibilizada con rFnBPA y rClfA y bloqueada con PBS 1X-BSA 2%. Posteriormente, se realizaron una serie de lavados con PBS 1X-Tween 0,05% y los anticuerpos fueron eluidos por incubación de las membranas con una solución de Glicina-HCl 0,1M (pH 2,3) y NaCl 0,15M. Las muestras de anticuerpos recuperadas fueron neutralizadas mediante el agregado de Tris 1M (pH 8).

ii. Ensayo de bloqueo: La capacidad de los anticuerpos purificados para bloquear la unión del Fb se evaluó como se describió anteriormente [114] con algunas modificaciones. Brevemente, placas de ELISA de 96 pocillos de fondo plano se sensibilizaron con 5 µg/pocillo de Fb en buffer carbonato de sodio (pH 9.6). El fibrinógeno se purificó a partir de plasma bovino mediante precipitación con etanol [115]. Los sitios restantes se bloquearon mediante incubación con leche en polvo descremada de cabra al 5% (p/v) disuelta en PBS a pH 7,4. Los anticuerpos purificados fueron diluidos en una suspensión 1×10^9 UFC/ml de cada *S. aureus* Reynolds y se pre-incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación suave. Como control positivo, se realizó la misma pre-incubación de las bacterias sin el agregado de suero. Las placas recubiertas se incubaron primero con 100 µl de bacterias pre-incubadas, luego con un suero de ratón anti-*S. aureus* y finalmente con un anticuerpo comercial anti-IgG murino conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Todas las incubaciones fueron de 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces con Tween 20 al 0,05% en PBS entre cada etapa. Finalmente, se añadió el sustrato enzimático (TMB, Invitrogen) y la reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 0,5 N. La absorbancia se leyó a 450 nm y los resultados se expresaron como porcentaje de unión con respecto al control positivo (bacteria sin opsonizar) considerado como capacidad de unión máxima.

2. Evaluar un esquema de inmunización en vaquillonas y vacas preñadas, utilizando la formulación seleccionada con base en los resultados previos.

2.1. Obtener la formulación elegida incluyendo los antígenos recombinantes rFnBPA, rClfA, α -toxina y β -toxina de *S. aureus*.

2.1.1.Composición del inmunógeno experimental: Se obtuvieron los antígenos recombinantes rFnBPA, rClfA y β -toxina por inducción de la expresión en *Escherichia coli*, a partir de clones previamente disponibles en el laboratorio [28,110]. Además, se obtuvo un cuarto antígeno recombinante correspondiente a la fracción madura de la α -toxina, también generado por nuestro grupo de trabajo, mediante el clonado de su secuencia codificante en el plásmido pET32a y su posterior expresión en *E. coli* BL21(DE3) (no publicado). El inmunógeno experimental consistió en una mezcla de 100 μ g/dosis de cada uno de los antígenos recombinantes (Rec) [28].

2.1.2.Formulación del inmunógeno experimental: El inmunógeno experimental fue formulado con liposomas y ODN-CpG (Lip+ODN-CpG+Rec) siguiendo el procedimiento descrito en el punto 1.1.2 del apartado Materiales y Métodos del presente capítulo.

2.2. Realizar un esquema de inmunización en vaquillonas y vacas de primer parto.

2.2.1.Animales experimentales y cronograma de vacunación: Se incluyeron en el estudio 23 vaquillonas primíparas y/o vacas con sólo 1 parto previo sin registros previos de mastitis, en el último trimestre de gestación. Las mismas se dividieron al azar en dos grupos. Uno de ellos se inoculó con 2 dosis de la formulación Lip+ODN-CpG+Rec por vía subcutánea en el área del ganglio supramamario, a los 45 y 15 días antes de la fecha probable de parto (Grupo Experimental, n=11), mientras que el restante actuó como control sin inmunizar (Grupo Control, n=12). Al momento de la segunda dosis vacunal las glándulas mamarias de todos los animales incluidos en el experimento se examinaron clínicamente por palpación y se tomaron muestras de secreción pre-parto para determinar la presencia de infección intramamaria por *S. aureus*. Todos los animales incluidos en el ensayo se encontraban libres de infección y sin signos clínicos de inflamación.

2.2.2.Procedimientos de muestreo: Se tomaron muestras de sangre por punción de la vena coccígea antes de cada inmunización, y de sangre y leche a los 15, 30 y 45 días luego de la segunda dosis, correspondientes a los 0, 15 y 30 días post-parto. Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y luego se centrifugaron para la obtención del suero. Por otro lado, se generaron muestras compuestas de leche utilizando partes iguales del material provenientes de cada cuarto. Las muestras de leche fueron centrifugadas y el sobrenadante de leche obtenido fue separado. Alternativamente, una fracción de cada muestra compuesta

fue acidificada y centrifugada para la obtención de suero de leche. Todas las muestras obtenidas fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

2.3. Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por la formulación.

2.3.1. Determinación de anticuerpos específicos: La presencia de anticuerpos (IgG, IgG1 e IgG2) específicos en las muestras de suero y suero de leche, fue evaluada por ELISA como se explicó en el punto 1.3.1 del apartado Materiales y Métodos del presente capítulo.

2.3.2. Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos: Dada la incorporación de α -toxina y β -toxina en el inmunógeno experimental, se realizó un ensayo de inhibición de la actividad de las toxinas nativas como se detalla a continuación:

- i. Obtención de α -toxina y β -toxina nativa de *S. aureus*: Se trabajó con las cepas de *S. aureus* 207 y 226 aisladas de casos de IIM, productoras de α -toxina y β -toxina, respectivamente. Las mismas se cultivaron en caldo Tripteína Soya a 37°C y transcurrido el tiempo adecuado se centrifugaron para recuperar el sobrenadante de cultivo. Este último fue filtrado con un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ para eliminar restos de bacterias enteras y se procedió a la purificación de las toxinas siguiendo el protocolo descrito por otros autores [116]. El producto se conservó a -20°C hasta su utilización. El extracto proteico obtenido se evaluó por SDS-PAGE al 15%, seguido de tinción con azul de Coomasie.
- ii. Inhibición de actividad hemolítica: Se tomaron $500\ \mu\text{l}$ de glóbulos rojos (GR) provenientes de conejo para la evaluación de α -toxina o de carnero para β -toxina y se diluyeron en solución diluyente de GR (para α -toxina: NaCl 150 mM, KH_2PO_4 20 mM, BSA 1 mg/mL, pH 7,4 [117]; para β -toxina: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/mL, BSA 1 mg/mL en PBS 1X [118]). Con base en los resultados obtenidos en ensayos de puesta a punto, se colocaron en una placa de 96 pocillos con fondo en U, $100\ \mu\text{l}$ de una dilución 1/3200 del purificado de α -toxina, o alternativamente $100\ \mu\text{l}$ de una dilución 1/160 del purificado de β -toxina. Seguidamente, se agregaron $100\ \mu\text{l}$ de los sueros de los animales a evaluar en una dilución 1/50. Todas las diluciones se realizaron en la solución diluyente de GR correspondiente según la toxina en evaluación. Se incubó durante 1 hora a 37°C y luego se agregaron $100\ \mu\text{l}$ de la suspensión de GR. Se incubó durante 2 horas a 37°C , y posteriormente, toda la noche (ON, por sus iniciales en inglés) a 4°C . Como control de hemólisis máxima, se incubaron GR en presencia de toxina y ausencia de suero. Como control de inhibición de la hemólisis se incubaron GR en ausencia tanto de toxina como de suero. Completada la incubación, se recuperaron los sobrenadantes y se realizó la lectura de su absorbancia a 545 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de

hemólisis respecto al control de hemólisis máxima. Finalmente, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre el porcentaje de hemólisis medido en las muestras y los niveles de cada inmunoglobulina detectados en las mismas. Este análisis se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

Tratamiento estadístico: La distribución normal fue confirmada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el test de ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni para detectar diferencias entre grupos ($p < 0,05$). Los resultados se informan como media \pm Error Estándar de la Media (EEM) para cada grupo. En caso de distribuciones no normales, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Mann-Whitney para la comparación entre grupos. En este caso los resultados fueron reportados como mediana \pm rango intercuartil (RI) para cada grupo. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

Consideraciones éticas: Todos los procedimientos en animales se realizaron siguiendo las recomendaciones de la *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching* [119] y cuentan con la aprobación tanto del Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación (FBCB-UNL) registrada en el acta 10/15, como del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio de INTA (CICUAL, INTA Rafaela), resolución número 18-006.

RESULTADOS

1. Diseñar y evaluar un esquema de inmunización hacia *S. aureus* en terneras.

1.1. Respuesta humoral generada por el esquema de 4 dosis.

1.1.1. Niveles de IgG anti-rFnBPA y anti-rClfA en suero.

Las terneras incorporadas en el esquema de inmunización recibieron una primera serie de 3 dosis administradas a los 0, 15 y 45 días de comenzado el plan. No se observaron efectos adversos en el sitio de inoculación a lo largo de todo el protocolo.

Se evaluaron los niveles de IgG en suero específicos para rFnBPA (Fig. 8-A) y rClfA (Fig. 8-B), alternativamente, a lo largo de todo el protocolo. Ningún animal presentó anticuerpos contra los antígenos recombinantes previos al plan de inmunización. Los adyuvantes solos, Al(OH)₃ y Lip+ODN-CpG, fueron incapaces de inducir *per se* la producción de anticuerpos específicos a lo largo de todo el protocolo. La administración de las proteínas recombinantes con un adyuvante comercial, Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA, indujo una respuesta inmune humoral específica hacia ambas, comprobando su antigenicidad. Esta formulación indujo una producción de anticuerpos significativamente mayor a su grupo control, Al(OH)₃, para rFnBPA entre los días 30 y 75 ($p < 0,001$), y para rClfA desde el día 30 al 60 ($p < 0,001$).

Por otro lado, se puede decir que los animales en el grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA, una vez administradas las dos primeras dosis, mantuvieron altos niveles de anticuerpos específicos para ambas proteínas, siendo mayores que los alcanzados por los grupos Lip+ODN-CpG, Lip+rFnBPA/rClfA y ODN-CpG+rFnBPA/rClfA, entre los días 30-75 de comenzado el plan ($p < 0,001$, en todos los casos). La administración de una tercera dosis no indujo un incremento significativo de los niveles de anticuerpos en ninguna de las formulaciones. Asimismo, se puede decir que la formulación Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA indujo niveles similares de IgG a los alcanzados por la formulación Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA a lo largo de todo el protocolo, excepto al día 45 cuando los niveles de IgG anti-rClfA resultaron mayores con la formulación liposomal ($p < 0,01$). Finalmente, ningún grupo presentó altos niveles de anticuerpos pasados 270 días de comenzado el plan.

Una vez transcurrido un año de la tercera dosis (día 410) se administró una cuarta dosis y se evaluaron los niveles de IgG específicos para cada proteína. Como se puede observar en la Fig. 8, a los 15 días de inoculados (día 425), los animales en el grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA fueron capaces de generar mayores niveles de IgG, para ambas proteínas, que los grupos Lip+ODN-CpG y ODN-CpG+rFnBPA/rClfA ($p < 0,001$, en ambos casos). A este tiempo, los niveles de IgG alcanzados por el grupo Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA fueron mayores a los de su control, Al(OH)₃, para ambas proteínas, rFnBPA ($p < 0,01$) y rClfA ($p < 0,05$). En este punto,

no se encontraron diferencias significativas entre los grupos $\text{Al}(\text{OH})_3$ +rFnBPA/rClfA, Lip+rFnBPA/rClfA y Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA. A dos meses de administrada la cuarta dosis, día 470, los niveles de anticuerpos en el grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA mostraron niveles incrementados de anticuerpos, aunque sin diferencia estadística respecto a los otros grupos evaluados.

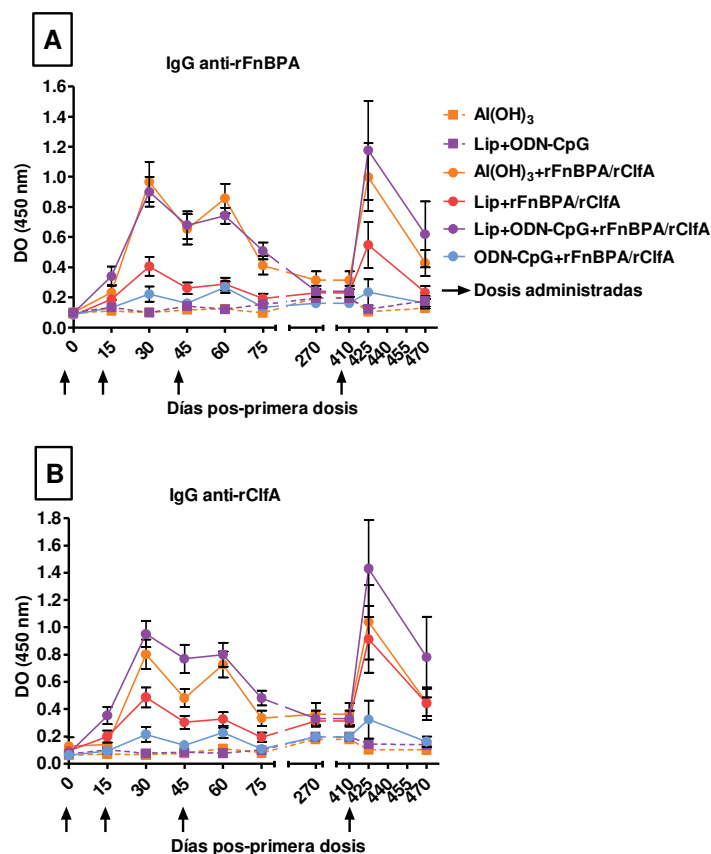


Fig. 8: Niveles de IgG específica en sueros de terneras inmunizadas con rFnBPA y rClfA incorporadas en diferentes formulaciones, por ELISA indirecto, durante el esquema de inmunización de cuatro dosis. Los sueros se probaron en una dilución 1/1000 contra cada antígeno: **A-** IgG anti-rFnBPA; **B-** IgG anti-rClfA. Como control se utilizaron sueros de terneras inmunizadas con formulaciones sin los antígenos (líneas punteadas). Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías. Se muestra un promedio de los valores obtenidos para siete u ocho animales en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 1.2.1 de Materiales y Métodos) y el EEM. Las flechas indican los tiempos de vacunación.

1.1.2. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA y anti-rClfA en suero.

Se determinaron los niveles de IgG1 e IgG2 específicos para cada proteína (Fig. 9) a los 15 días de administrada la tercera dosis (Día 60) y a los 15 días de la cuarta dosis (Día 425).

Respecto a la producción de IgG1, todas las formulaciones experimentales fueron capaces de incrementar los niveles de anticuerpos específicos tanto para rFnBPA (Fig. 9-A) como para rClfA (Fig. 9-C) al día 60. A este tiempo, el grupo $\text{Al}(\text{OH})_3$ +rFnBPA/rClfA presentó los mayores niveles de anticuerpos. Sin embargo, luego de administrada la cuarta dosis, los grupos Lip+rFnBPA/rClfA y Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA alcanzaron niveles similares de IgG1 a los

alcanzados por el grupo $\text{Al}(\text{OH})_3 + \text{rFnBPA}/\text{rClfA}$ en este mismo tiempo. Cabe destacar que tanto la formulación $\text{Al}(\text{OH})_3 + \text{rFnBPA}/\text{rClfA}$ como $\text{Lip} + \text{ODN-CpG} + \text{rFnBPA}/\text{rClfA}$ indujeron niveles de IgG1 significativamente mayores a sus controles a los dos tiempos evaluados, para ambas proteínas con distintos grados de significancia, como se puede observar en los respectivos gráficos.

En relación a la producción de IgG2 específicos para rFnBPA (Fig. 9-B) o para rClfA (Fig. 9-D), al día 60 ningún grupo fue capaz de generar diferencias significativas respecto a sus grupos controles. Sin embargo, al día 425, la formulación $\text{Lip} + \text{ODN-CpG} + \text{rFnBPA}/\text{rClfA}$ fue capaz de incrementar significativamente los niveles de IgG2 para ambas proteínas ($p < 0,05$), mientras que una cuarta dosis de la formulación $\text{Al}(\text{OH})_3 + \text{rFnBPA}/\text{rClfA}$ resultó en un aumento de los niveles de IgG2 que resultó significativo sólo contra rClfA ($p < 0,01$) (Fig. 2-D).

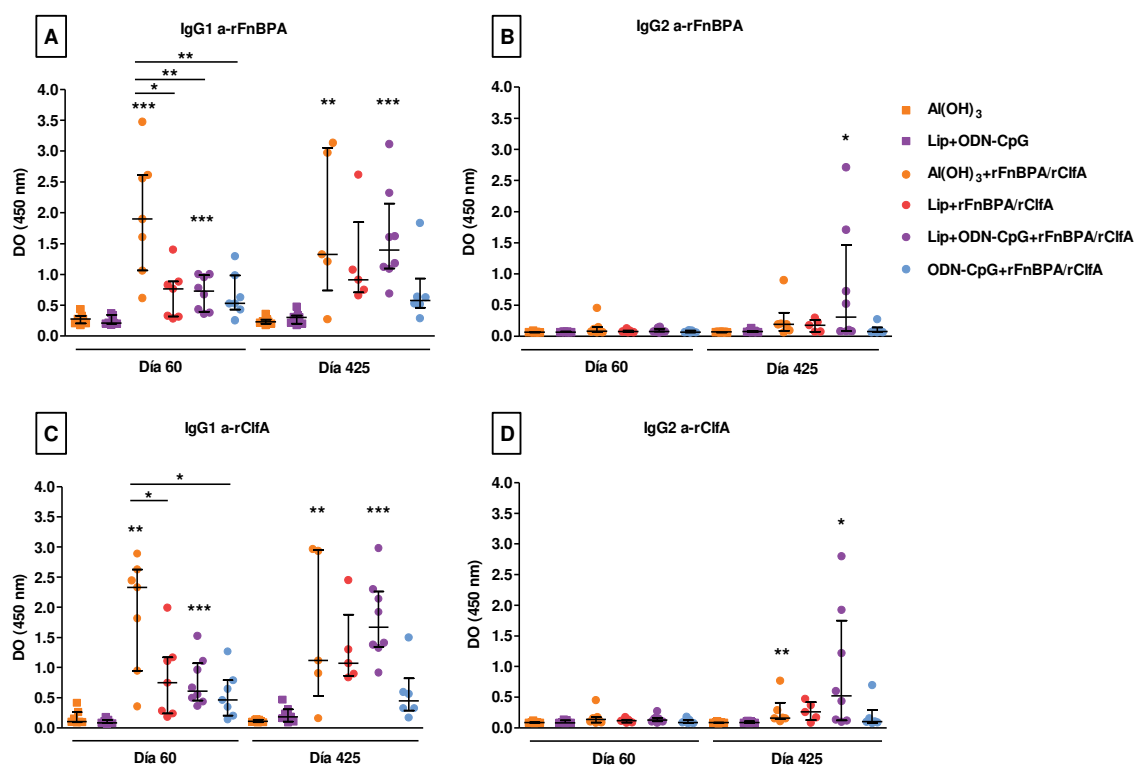


Fig. 9: Niveles de IgG1 e IgG2 específicas en sueros de terneras inmunizadas con rFnBPA y rClfA incorporadas en diferentes formulaciones, mediante ELISA indirecto, evaluados en los días 60 y 425 del esquema de inmunización (correspondiente a 15 días después de la tercera y cuarta dosis, respectivamente). Los sueros se probaron en una dilución 1/1000 contra cada antígeno: **A-** IgG1 anti-rFnBPA; **B-** IgG2 anti-rFnBPA; **C-** IgG1 anti-rClfA; **D-** IgG2 anti-rClfA. Como control se utilizaron sueros de terneras inmunizados con formulaciones sin antígenos. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para siete u ocho animales en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 1.2.1 de Materiales y Métodos) y el RI. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, respecto a los grupos control. Las comparaciones entre grupos se indican con líneas.

1.2. Respuesta humoral generada a partir del refuerzo pre-parto.

1.2.1. Niveles de IgG anti-rFnBPA y anti-rClfA en suero.

Se realizó el seguimiento de las terneras que se incluyeron en el plan de inmunización hasta su primer parto cuando recibieron un refuerzo pre-parto (aproximadamente 18 meses desde el comienzo del plan de inmunización). Veinticinco animales debieron ser excluidos en esta etapa debido a distintos factores ajenos al estudio, como fallos en la inseminación, abortos o muerte. Por este motivo los grupos quedaron conformados de la siguiente manera: Al(OH)₃ (n=5), Lip+ODN-CpG (n=3), Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA (n=2), Lip+rFnBPA/rClfA (n=3), ODN-CpG+rFnBPA/rClfA (n=2) y Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA (n=4).

Luego del refuerzo, administrado aproximadamente 21 días previo a la fecha estimada de parto, se evaluaron los niveles de IgG específica hacia rFnBPA (Fig. 10-A) y rClfA (Fig. 10-B) en suero, hasta pasados 21 días del parto. El grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA demostró un rápido incremento en los niveles de anticuerpos para ambas proteínas, que fue sostenido a lo largo del tiempo de observación, incluyendo el momento del parto. Si bien estas diferencias no resultaron significativas respecto al resto de los grupos evaluados, los resultados permiten observar una tendencia clara, en este grupo, al aumento de los niveles de anticuerpos tras la aplicación de una única dosis.

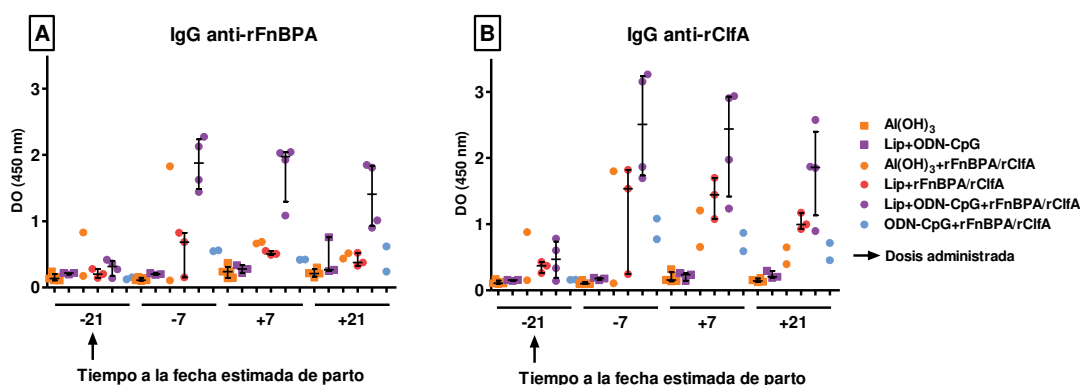


Fig. 10: Niveles de IgG específica en sueros de vaquillonas primíparas después del refuerzo pre-parto con rFnBPA y rClfA incorporadas en diferentes formulaciones, por ELISA indirecto. El refuerzo se administró aproximadamente 21 días antes de la fecha de parto esperada. Los sueros se probaron en una dilución 1/1000 contra cada antígeno: **A-** IgG anti-rFnBPA; **B-** IgG anti-rClfA. Como control se utilizaron sueros de terneras inmunizadas con formulaciones sin antígenos. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney para hacer una comparación entre aquellos grupos con un $n \geq 3$, en un mismo punto de tiempo. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para tres a cinco sueros en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 1.2.1 de Resultados) y el RI. La flecha indica el tiempo del refuerzo pre-parto.

1.2.2. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA y anti-rClfA en suero.

Se estudiaron los niveles de IgG1 e IgG2 específica para ambas proteínas en muestras obtenidas al día -7, correspondiente a 15 días post-refuerzo (Fig. 11).

La producción de anticuerpos IgG1 específicos para ambas proteínas (Fig. 11-A) fue estimulada por las formulaciones Lip+rFnBPA/rClfA y Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA. Sin embargo, sólo el grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA generó niveles significativamente superiores respecto a su grupo control ($p < 0,05$). Respecto a los niveles de IgG2 (Fig. 11-B), sólo la formulación Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA fue capaz de inducir un aumento en este subtipo, en 2 de 4 animales. Sin embargo, este incremento sólo resultó significativo para anti-rClfA ($p < 0,05$). Asimismo, una tendencia hacia la estimulación de la producción de IgG1 específica para ambas proteínas fue evidenciada en las formulaciones $Al(OH)_3+rFnBPA/rClfA$ y $ODN-CpG+rFnBPA/rClfA$.

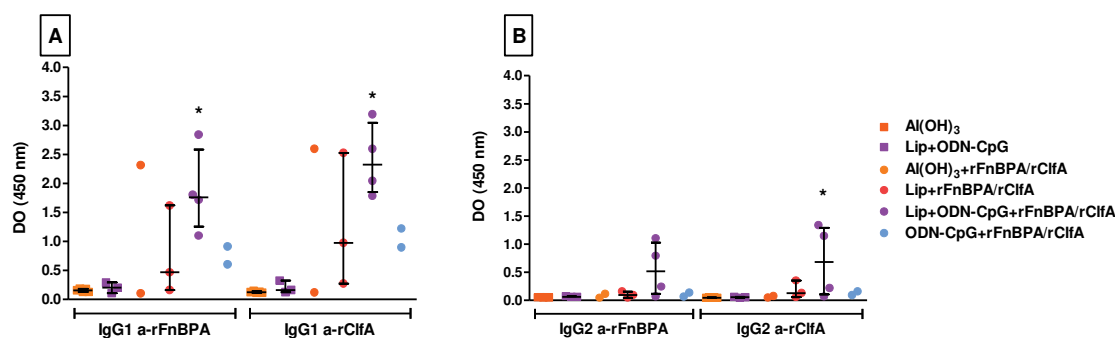


Fig. 11: Niveles de IgG1 e IgG2 específicas en sueros de vaquillonas primíparas después del refuerzo pre-parto con rFnBPA y rClfA incorporadas en diferentes formulaciones, por ELISA indirecto. Las muestras analizadas fueron obtenidas al día -7, correspondiente a 15 días después de aplicado el refuerzo. Los sueros se probaron en una dilución 1/1000 contra cada antígeno: **A-** IgG1 anti-rFnBPA y anti-ClfA; **B-** IgG2 anti-rFnBPA y anti-rClfA. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney para hacer una comparación entre aquellos grupos con un $n \geq 3$. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para tres a cinco sueros en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 1.2.1 de Resultados) y el RI. * $p < 0,05$, respecto a los grupos de control.

1.2.3. Niveles de IgG anti-rFnBPA y anti-rClfA en leche.

Se recolectaron muestras de leche a los días +7 y +21, dado que en este periodo ya todos los animales se encontraban en lactancia.

Se analizaron los niveles de IgG específicos para rFnBPA (Fig. 12-A) y rClfA (Fig. 12-B) en suero de leche, resultando los animales del grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA los que tendieron a presentar mayores niveles de IgG para ambas proteínas. Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas.

1.2.4. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA y anti-rClfA en leche.

A su vez, se estudiaron los niveles de IgG1 (Fig. 12-C) e IgG2 específicos para ambas proteínas, sobre las muestras de suero de leche tomadas al día +7, dado que fue el tiempo en el que se encontraron los mayores niveles de IgG. Sólo el grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA presentó niveles mayores de IgG1 comparado con el grupo control ($p < 0,05$). No se detectó IgG1 específica en las muestras obtenidas de animales pertenecientes a otros grupos experimentales.

Respecto a la presencia de IgG2, ningún grupo presentó niveles detectables de esta inmunoglobulina en suero de leche (datos no mostrados).

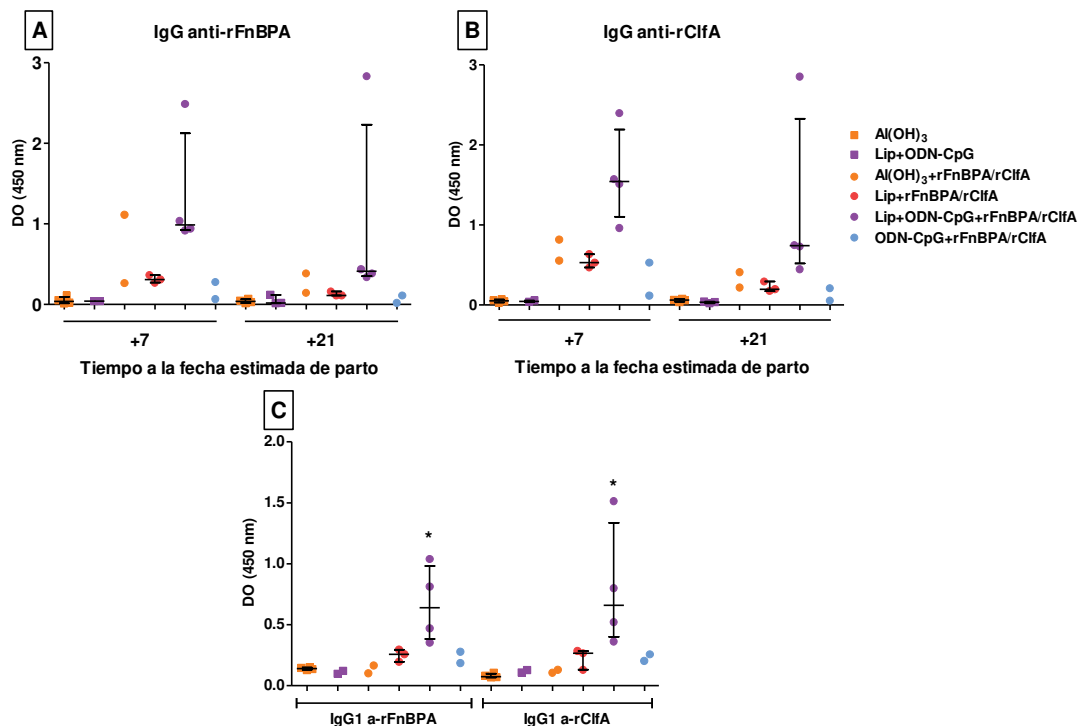


Fig. 12: Niveles de IgG e IgG1 específicas en suero de leche de vaquillonas primíparas después del refuerzo pre-parto con rFnBPA y rClfA incorporadas en diferentes formulaciones, por ELISA indirecto. La IgG se evaluó a los días +7 y +21 y la IgG1 el día +7. El refuerzo se administró aproximadamente 21 días antes de la fecha prevista de parto. El suero de leche se probó en una dilución 1/100 contra cada antígeno: **A-** IgG anti-rFnBPA; **B-** IgG anti-rClfA; **C-** IgG1 anti-rFnBPA y anti-rClfA. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney para hacer una comparación entre aquellos grupos con un $n \geq 3$, en un mismo punto de tiempo. Se muestra la mediana de los resultados obtenidos para tres a cinco sueros en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 1.2.1 de Resultados) y el RI. * $p < 0,05$, respecto a los grupos control.

1.3. Funcionalidad de los anticuerpos.

1.3.1. Capacidad de bloqueo.

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos presentes en las muestras de suero obtenidas al día -7, 15 días luego del refuerzo pre-parto, de evitar la unión de *S. aureus* Reynolds a fibrinógeno *in vitro*. Para esto, en primera instancia se purificaron los anticuerpos específicos presentes en las muestras mediante el contacto individual de cada suero con una membrana de nitrocelulosa sensibilizada con los antígenos estudiados. Luego de una serie de lavados los anticuerpos fueron eluidos resultando una muestra enriquecida en anticuerpos anti-rFnBPA y anti-rClfA para cada animal. Estas muestras fueron finalmente evaluadas mediante un ELISA diseñado específicamente para la determinación de la capacidad de bloqueo.

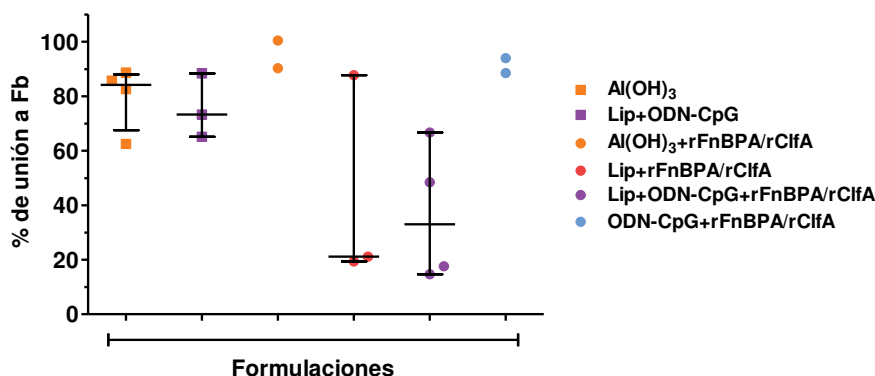


Fig. 13: Análisis funcional *in vitro* de los anticuerpos presentes en sueros de vaquillonas primíparas después del refuerzo pre-parto con rFnBPA y rClfA incorporadas en diferentes formulaciones. La capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de *S. aureus* Reynolds al fibrinógeno (Fb) se probó con las muestras del día -7, correspondiente a 15 días post refuerzo. El refuerzo se administró aproximadamente 21 días antes de la fecha de parto esperada. Los anticuerpos purificados se diluyeron 1/200 en una suspensión de 1×10^9 UFC/ml de *S. aureus* Reynolds. Se usó la suspensión bacteriana sin anticuerpos como control positivo de unión a Fb. Los resultados se expresaron como porcentaje de unión con respecto al control positivo considerado como capacidad máxima de unión (100%). Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney para hacer una comparación entre los grupos con un $n \geq 3$. Se muestra la mediana de los resultados obtenidos para tres a cinco sueros en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 1.2.1 de Resultados) y el RI.

Como se puede observar en la Fig. 13, la pre-incubación de *S. aureus* Reynolds con los anticuerpos obtenidos de los animales en los grupos Lip+rFnBPA/rClfA y Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA tendieron a disminuir la unión de la bacteria a Fb.

2. Evaluar un esquema de inmunización en vaquillonas y vacas preñadas, utilizando la formulación seleccionada con base en los resultados previos.

2.1. Respuesta humoral generada por el esquema de 2 dosis al pre-parto.

2.1.1. Niveles de IgG anti-rFnBPA, anti-rClfA, anti- α -toxina y anti- β -toxina en suero.

Las vaquillonas y vacas preñadas, incorporadas en el esquema de inmunización, recibieron 2 dosis de una formulación compuesta por rFnBPA, rClfA, α -toxina, β -toxina y Lip+ODN-CpG, (Lip+ODN-CpG+Rec), administradas a los 0 y 30 días de comenzado el plan, correspondientes respectivamente a los 45 y 15 días previos a la fecha estimada de parto. No se observaron efectos adversos en el sitio de inoculación a lo largo de todo el protocolo.

Se evaluaron los niveles de IgG en suero específicos para cada una de las proteínas recombinantes (Fig. 14) alternativamente, hasta pasado un mes de la fecha probable de parto. Ningún animal presentó anticuerpos contra los antígenos rFnBPA y rClfA previos al plan de inmunización, sin embargo, se detectaron bajos niveles de anticuerpos anti- α -toxina y anti- β -toxina en algunos animales, sin diferencias significativas entre los dos grupos evaluados. El grupo

control fue incapaz de inducir *per se* la producción de anticuerpos específicos a lo largo de todo el protocolo.

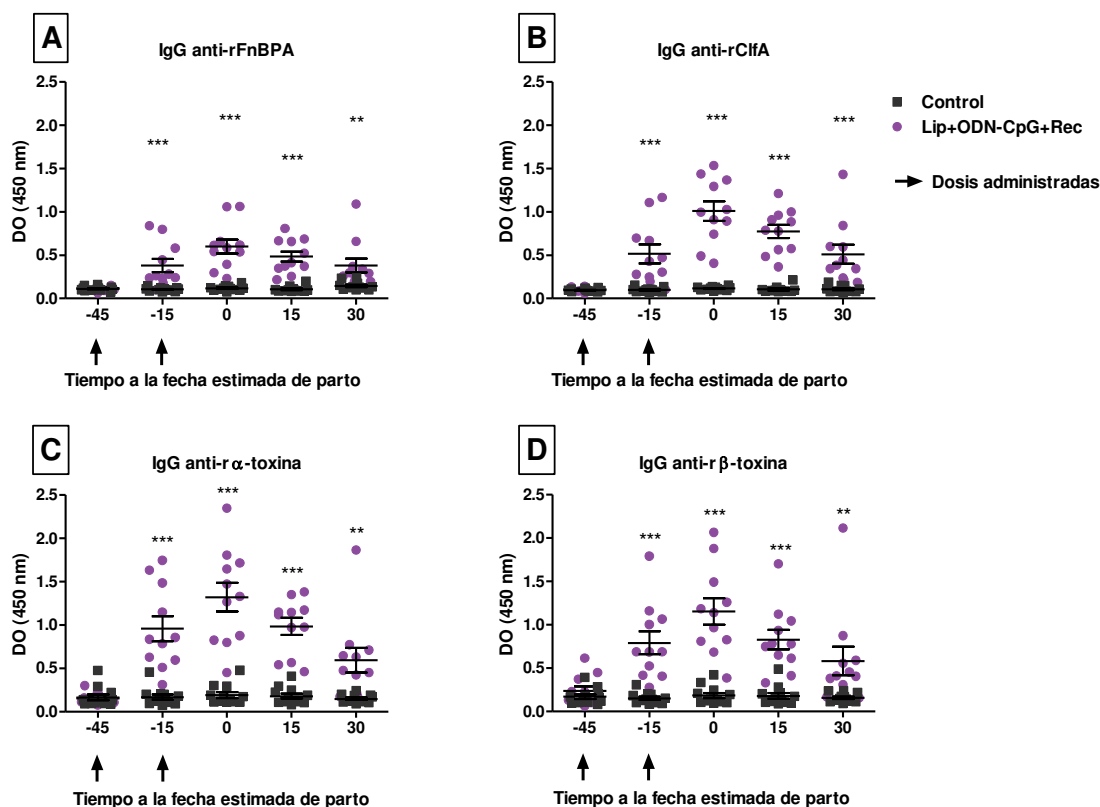


Fig. 14: Niveles de IgG específica en sueros de vaquillonas inmunizadas con rFnBPA, rClfA, r α -toxina y r β -toxina incorporadas en la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, por ELISA indirecto, durante un esquema de inmunización de dos dosis al pre-parto. Los sueros se probaron en una dilución 1/1000 contra cada antígeno: **A-** IgG anti-rClfA; **B-** IgG anti-rFnBPA; **C-** IgG anti-r α -toxina; **D-** IgG anti-r β -toxina. Como control se utilizaron sueros de vaquillonas no inmunizadas. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías. Se muestra un promedio de los valores obtenidos para once o doce animales en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 2.2.1 de Materiales y Métodos) y el EEM. **p<0,01; ***p<0,001, respecto al grupo control. Las flechas indican los tiempos de vacunación.

Respecto al grupo inmunizado con la formulación Lip+ODN-CpG+Rec se puede decir que los animales alcanzaron niveles de IgG específicos superiores a los alcanzados por el grupo control, para los cuatro antígenos, desde el día -15 hasta el final del periodo evaluado (p<0,001, desde el día -15 al +15 para todos los antígenos). Como se puede observar, si bien con la aplicación de la primera dosis se logró inducir la producción de anticuerpos específicos, la aplicación de la segunda dosis consigue aumentar sus niveles, obteniéndose un pico máximo al momento estimado de parto. Luego de este pico, se produjo una disminución progresiva de los niveles de anticuerpos en este grupo, sin embargo, hasta el último tiempo evaluado, estos permanecieron por encima de los valores alcanzados por el grupo control (p<0,001, para rClfA; p<0,01, para el resto de los antígenos).

2.1.2. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA, anti-rClfA, anti-r α -toxina y anti-r β -toxina en suero.

Se determinaron los niveles de IgG1 e IgG2 específicos para cada proteína (Fig. 15) a los 15 días de administrada la segunda dosis (Día 0).

Respecto a la producción de IgG1, la formulación experimental fue capaz de incrementar los niveles de anticuerpos específicos para los cuatro antígenos, rFnBPA (Fig. 15-A), rClfA (Fig. 15-B), r α -toxina (Fig. 15-C) y r β -toxina (Fig. 15-D), respecto al grupo control ($p < 0,001$, en todos los casos). También se detectó un aumento, aunque de menor magnitud, en los niveles de IgG2 en el grupo tratado respecto al grupo control para las cuatro proteínas ($p < 0,01$, para rFnBPA; $p < 0,001$, para el resto de los antígenos).

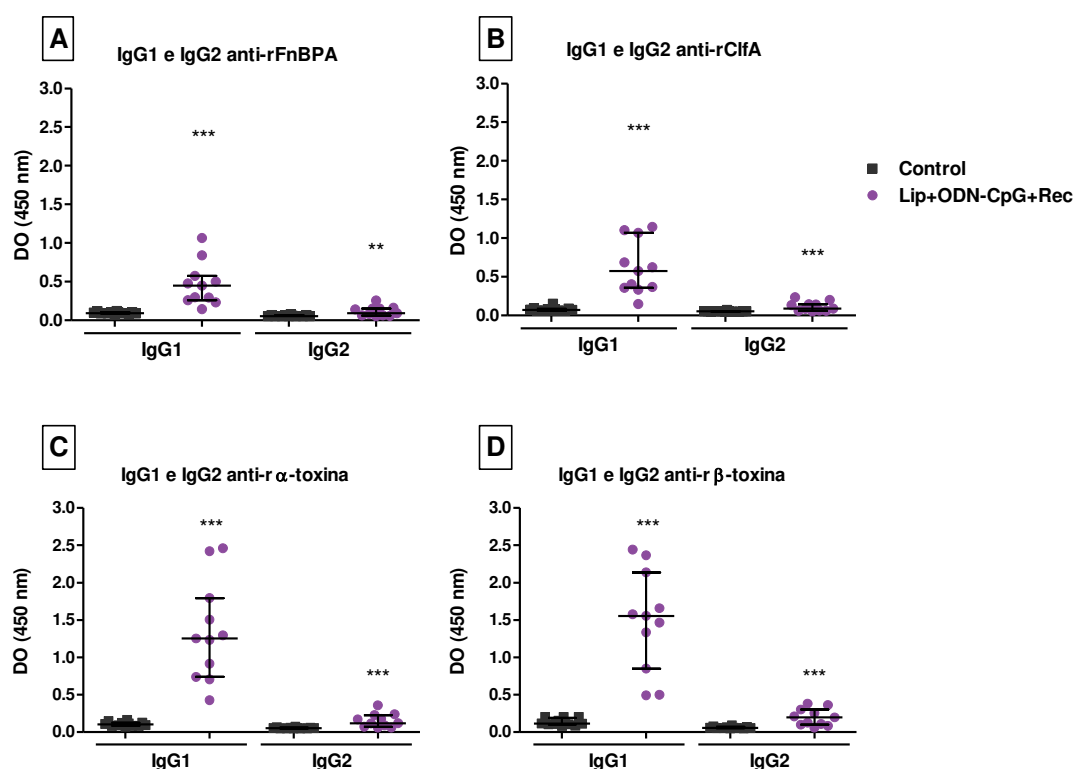


Fig. 15: Niveles de IgG1 e IgG2 específicas en sueros de vaquillonas inmunizadas con rFnBPA, rClfA, r α -toxina y r β -toxina incorporadas en la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, mediante ELISA indirecto, evaluados al momento del parto (correspondiente a 15 días después de la segunda dosis). Los sueros se probaron en una dilución 1/1000 contra cada antígeno: **A-** IgG1 e IgG2 anti-rClfA; **B-** IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA; **C-** IgG1 e IgG2 anti-r α -toxina; **D-** IgG1 e IgG2 anti-r β -toxina. Como control se utilizaron sueros de vaquillonas no inmunizadas. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para once o doce animales en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 2.2.1 de Materiales y Métodos) y el RI. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, respecto al grupo control.

2.1.3. Niveles de IgG anti-rFnBPA, anti-rClfA, anti-r α -toxina y anti-r β -toxina en leche.

Se recolectaron muestras de leche luego de 15, 30 y 45 días de la segunda dosis, correspondientes a los días 0, +15 y +30 post-parto. En esta etapa se incluyeron sólo las muestras

de aquellos animales que se encontraban en lactancia, motivo por el cual el número de muestras al día 0 resultó menor, al corresponder algunas de ellas a animales aún en pre-parto.

Se analizaron los niveles de IgG específicos para rFnBPA (Fig. 16-A), rClfA (Fig. 16-B), α -toxina (Fig. 16-C) y β -toxina (Fig. 16-D) en suero de leche. Los 5 animales tratados que pudieron ser incorporados al día 0 tendieron a presentar mayores niveles de IgG que los controles, para dos de las cuatro proteínas evaluadas, rFnBPA y rClfA. Mientras que sólo 1 de los 5 presentó un aumento en los niveles de IgG anti- α -toxina y anti- β -toxina en leche, para este tiempo. Al día +15, el grupo Lip+ODN-CpG+Rec presentó una pequeña tendencia al aumento respecto al grupo control para los antígenos rFnBPA y rClfA, con un descenso para el día +30. Sólo un animal del grupo tratado permaneció con niveles elevados de IgG contra tres de los cuatro antígenos, hasta el último tiempo evaluado. En ningún caso, las diferencias observadas resultaron significativas.

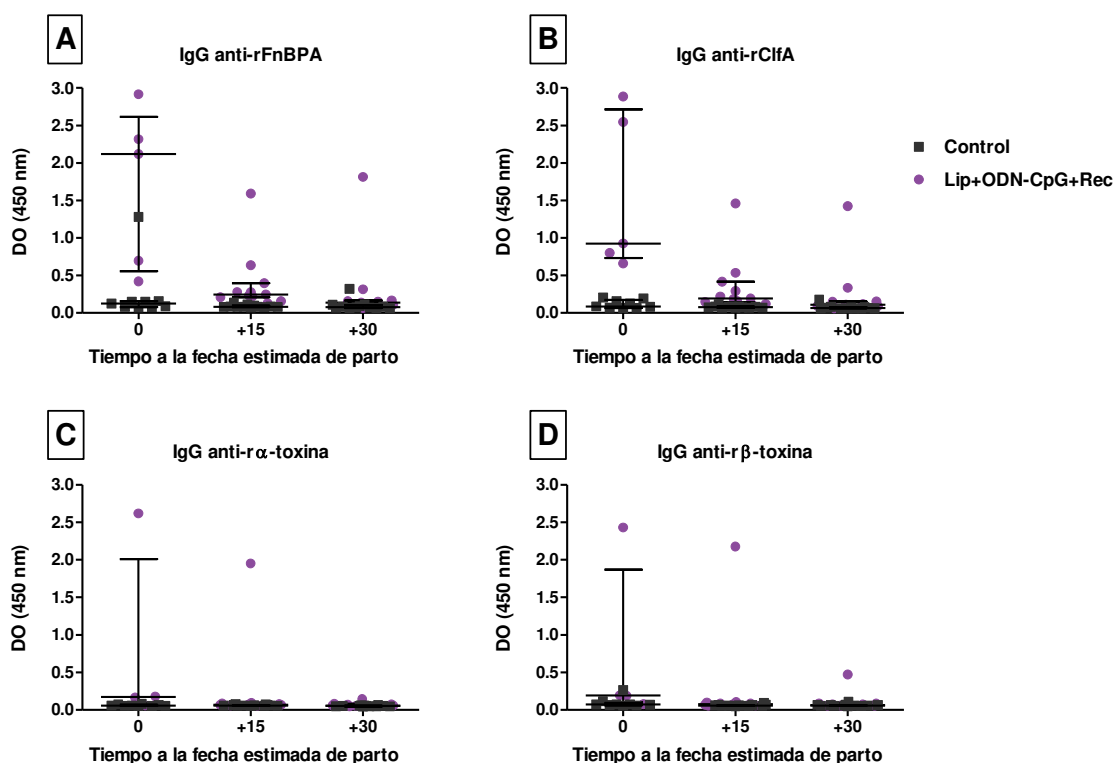


Fig. 16: Niveles de IgG específicas en suero de leche de vaquillonas inmunizadas con rFnBPA, rClfA, α -toxina y β -toxina incorporadas en la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, por ELISA indirecto, a partir del momento del parto. Los sueros de leche se probaron en una dilución 1/100 contra cada antígeno: **A-** IgG anti-rClfA; **B-** IgG anti-rFnBPA; **C-** IgG anti- α -toxina; **D-** IgG anti- β -toxina. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney a cada tiempo. Se muestra la mediana de los resultados obtenidos para once o doce animales en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 2.2.1 de Resultados) y el RI. Al tiempo 0, se debieron eliminar 6 muestras del grupo tratado y 3 del grupo control por ser muestras de calostro.

2.1.4. Niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFnBPA, anti-rClfA, anti-r α -toxina y anti-r β -toxina en leche.

Debido a los bajos niveles de IgG detectados en suero de leche, no se realizó la determinación de los subtipos IgG1 e IgG2 específicos para cada antígeno, en estas muestras.

2.2. Funcionalidad de los anticuerpos.

2.2.1. Inhibición de la actividad hemolítica.

Se decidió evaluar la capacidad de los anticuerpos presentes en las muestras de suero, obtenidas al día 0, 15 días luego de la segunda dosis, de inhibir la hemólisis causada por las toxinas nativas, obtenidas de dos cepas de *S. aureus*, una productora de α -toxina y otra de β -toxina. Para esto, en primera instancia una dilución de cada uno de los sueros evaluados se puso en contacto con cada una de las toxinas. Pasado un tiempo determinado de incubación, los sueros junto a las toxinas se pusieron en contacto con GR de conejo o carnero según se tratara de la evaluación de la α -toxina o β -toxina, respectivamente. Luego de una incubación *ON*, se tomaron los sobrenadantes y, mediante la lectura de su absorbancia a 545 nm, se evaluó el porcentaje de hemólisis en cada muestra en función de un control de hemólisis máxima, en el cual los GR fueron puestos en contacto con las toxinas en ausencia de suero.

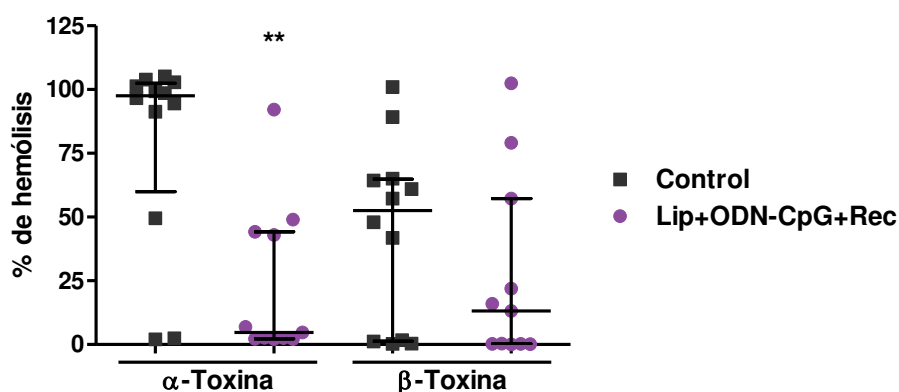


Fig. 17: Capacidad de los sueros de vaquillonas inmunizadas con la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, de inhibir la actividad hemolítica de las proteínas α -toxina y β -toxina obtenidas a partir de dos cepas de *S. aureus* productoras. Para este ensayo se utilizaron los sueros obtenidos al día 0, correspondiente a 15 días post segunda dosis. Los sueros fueron pre-incubados en una dilución 1/50 con cada toxina y posteriormente incubados *ON* en contacto con glóbulos rojos de conejo (α -toxina) o cordero (β -toxina). Las toxinas sin pre-incubar con las muestras fueron puestas en contacto con los respectivos glóbulos rojos como control de hemólisis, considerado el 100% de hemólisis. En la gráfica se observa el porcentaje de hemólisis en cada muestra, calculada en función de los valores obtenidos para los controles de hemólisis. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney para cada toxina. Se muestra la mediana de los resultados obtenidos para once o doce animales en cada grupo (de acuerdo con las especificaciones del punto 2.2.1 de Resultados) y el RI. *** $p < 0,01$, respecto al grupo control.

Como se puede observar en la Fig. 17, la pre-incubación de la α -toxina con los sueros obtenidos de los animales del grupo Lip+ODN-CpG+Rec disminuyó el porcentaje de hemólisis respecto al grupo control ($p < 0,01$).

Por otro lado, al realizar el estudio de la inhibición de la actividad de la β -toxina, se observó una tendencia a la disminución en el porcentaje de hemólisis en los animales tratados respecto a los controles, aunque sin diferencia estadística. Sin embargo, debe resaltarse que 8 de 11 animales del grupo Lip+ODN-CpG+Rec presentaron un porcentaje de hemólisis menor al 25%, mientras que 4 de 12 alcanzaron estos niveles en el grupo control.

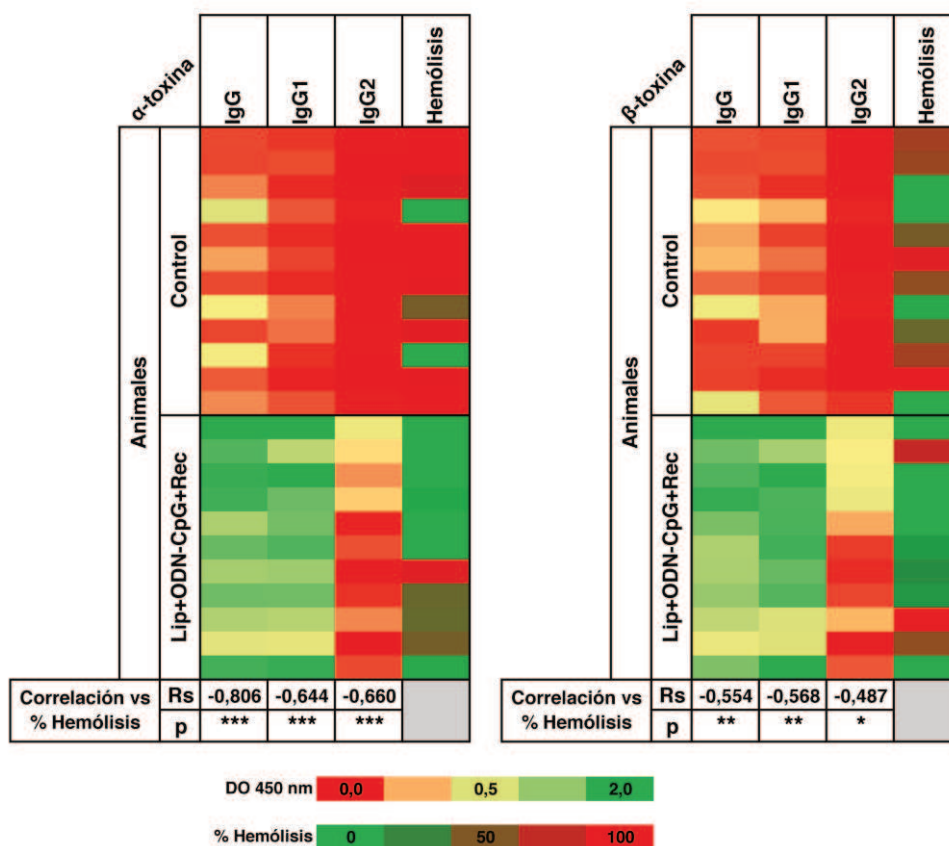


Fig. 18: Matriz de resultados de la respuesta humoral hacia α -toxina o β -toxina, en suero al día 0, correspondiente a 15 días post 2da dosis. Se representan, en cada fila, los valores obtenidos para cada animal en cada grupo. En las primeras 3 columnas se encuentran, respectivamente, los valores de DO obtenidos al medir IgG, IgG1 e IgG2. En verde se representan los valores cercanos a 2,0 (altos niveles de anticuerpos), en amarillo cercanos a 0,5 (niveles medios de anticuerpos) y en rojo cercanos a 0 (bajos niveles de anticuerpos). En la cuarta columna se representan los porcentajes de hemólisis obtenidos. En verde se observan los valores cercanos a 0% (bajo porcentaje de hemólisis) y en rojo los valores cercanos a 100% (alto porcentaje de hemólisis). Al final de las tablas se observan los resultados del análisis de correlación de Spearman realizado para cada inmunoglobulina en relación al porcentaje de hemólisis obtenido para cada toxina. Rs: coeficiente de correlación de Spearman. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, probabilidad de la correlación.

En la Fig. 18, se resumieron en una matriz los resultados de la respuesta humoral, específica hacia α -toxina y β -toxina, junto con la inhibición de la hemólisis, obtenidos en las muestras de suero de los animales al día 0, correspondiente al momento del parto. En los resultados obtenidos para la α -toxina, se evidencia que los tres animales del grupo control que presentaron un porcentaje de hemólisis igual o menor al 50%, correspondían a animales en los

que se detectaron niveles de IgG anti-r α -toxina cercanos a 0,5 DO. Respecto al grupo tratado, un único animal mostró un porcentaje de hemólisis mayor al 50%, a pesar de presentar anticuerpos específicos contra r α -toxina. Al analizar los resultados obtenidos para β -toxina, se observa que en 3 de los 4 animales del grupo control, que presentaron un porcentaje de hemólisis menor al 25%, los niveles de IgG anti-r β -toxina fueron cercanos a 0,5 DO. Asimismo, semejante a lo observado para α -toxina, los 3 animales tratados con un porcentaje de hemólisis mayor al 50%, presentaban anticuerpos específicos contra r β -toxina.

En estas matrices, también se puede observar los resultados obtenidos en el análisis de correlación de Spearman, donde se compararon los niveles de las distintas inmunoglobulinas con el porcentaje de hemólisis para cada toxina. Todas las correlaciones encontradas fueron negativas, es decir que, a mayores niveles de la inmunoglobulina en estudio en esa muestra, menor es el porcentaje de hemólisis observado. En el caso del porcentaje de hemólisis generado por α -toxina, se encontró una fuerte correlación con los niveles de IgG ($R_s = -0,806$; $p < 0,001$) y una moderada correlación con los niveles de IgG1 e IgG2 ($R_s = -0,644$; $p < 0,001$ y $R_s = -0,660$; $p < 0,001$, respectivamente). Por su lado, para β -toxina, todas las correlaciones encontradas fueron de tipo moderada (IgG: $R_s = -0,554$; $p < 0,01$; IgG1: $R_s = -0,568$; $p < 0,01$ e IgG2: $R_s = -0,487$; $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se evaluó la capacidad de una vacuna a subunidades que incluyó distintos antígenos recombinantes de *S. aureus* formulados con un adyuvante liposomal previamente evaluado por nuestro grupo en ratones de la cepa BALB/c [67]. En una primera instancia se evaluó la respuesta inmune generada en un grupo de terneras que comenzaron el plan de inmunización a los 6-8 meses de edad y recibieron distintos refuerzos hasta alcanzar su primer parto. En este ensayo los animales fueron inmunizados con dos antígenos recombinantes, rFnBPA y rClfA, formulados con distintos adyuvantes: Al(OH)₃, Lip, ODN-CpG o la combinación Lip+ODN-CpG. Con base en la respuesta inmune humoral obtenida con cada formulación a lo largo de este primer protocolo, se escogió este último adyuvante para continuar con la segunda instancia. En esta etapa, se inmunizaron vaquillonas y vacas preñadas con cuatro antígenos recombinantes, rFnBPA, rClfA, α -toxina y β -toxina formulados con el adyuvante Lip+ODN-CpG, y se evaluó la respuesta inmune humoral generada en estos animales hasta pasado un mes del parto. La inmunogenicidad de todos los antígenos incorporados, con excepción de α -toxina, fue probada por nuestro grupo en ensayos previos [28,110]. En conjunto, se buscó identificar un adyuvante capaz de generar una respuesta inmune apropiada para combatir las infecciones por *S. aureus* en bovinos, así como también, conocer los efectos del plan de inmunización implementado sobre esta respuesta inmune.

De la respuesta inmune generada en terneras.

En esta primera etapa, se evaluó la respuesta inmune humoral generada en terneras inmunizadas con los antígenos recombinantes rClfA y rFnBPA. Este inmunógeno fue formulado, alternativamente, con un adyuvante comercial, AlhydrogelTM o un adyuvante basado en liposomas catiónicos previamente evaluados por nuestro grupo en un modelo murino [67]. A su vez, se evaluó el efecto de la incorporación de ODN-CpG como inmunoestimulante en las formulaciones. La secuencia de oligonucleótidos utilizada para este fin corresponde al ODN-CpG 2007, específico para los TLR9 bovino y porcino, sintetizada con enlaces naturales de tipo fosfodiéster [113]. A pesar de la susceptibilidad de estos oligonucleótidos a la acción de ADNasas, existe un consenso entre autores que sugieren que su incorporación en liposomas, puede brindar un método válido para protegerlos de la degradación y prolongar su vida media [120]. En el capítulo 2 de la presente tesis, se desarrolla una discusión más profunda sobre los beneficios de la utilización de oligonucleótidos con enlaces naturales, así como de la capacidad de los liposomas utilizados en nuestros ensayos de proteger a estos ODN-CpG de la degradación mediada por nucleasas. Aunque el uso de formulaciones que usan liposomas catiónicos u ODN-CpG como adyuvantes en el ganado bovino es bien conocido [121], existe poca información sobre el uso conjunto de ambos

componentes en esta especie. Hasta donde conocemos, el único reporte en bovinos de su uso combinado, es el inmunoestimulante comercial Zelnote™ (Bayer HealthCare LLC, MO, USA). Este inmunoestimulante, en lugar de utilizar un ODN-CpG, está formulado con liposomas catiónicos combinados con ADN plasmídico bacteriano rico en motivos CpG no metilados. El uso del mismo está destinado a reducir el uso de antibióticos en el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina causada por *Mannheimia haemolytica*, buscando estimular las defensas propias del animal. Su utilización está indicada en ganado a partir de los 4 meses de edad y debe ser administrada en el momento o dentro de las 24 horas de percibido un evento estresante en el animal [122]. Asimismo, se debe resaltar, que no hemos encontrado antecedentes sobre el uso de liposomas catiónicos combinados con ODN-CpG con enlaces fosfodiéster en la inmunización antígeno específica de bovinos.

Por otro lado, hemos encontrado sólo 2 reportes de la utilización de planes de inmunización contra *S. aureus* en bovinos aplicados a temprana edad [92,109]. A pesar de los beneficios observados en la aplicación de este tipo plan, respecto a la inmunización de animales en etapas tardías, la mayoría de los nuevos desarrollos de vacunas para la prevención de mastitis, causada por *S. aureus*, han sido probados al pre-parto. Teniendo en cuenta estas consideraciones, otro enfoque novedoso incorporado en el presente trabajo fue la aplicación de un programa de vacunación a partir de una edad temprana, buscando la prevención de las infecciones intramamarias antes del comienzo de la lactancia.

En una primera etapa de este plan de inmunización, se evaluó la respuesta inmune humoral en terneras de 6-8 meses de edad, que recibieron un esquema de 3 dosis, a los 0, 15 y 45 días de comenzado el plan y un refuerzo al año de completado este esquema. Luego de la segunda dosis, se observó un incremento significativo en la respuesta inmune humoral, medida en suero, en los animales que recibieron las formulaciones Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA e Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA. La aplicación de la tercera dosis no incrementó los niveles de IgG específica respecto a los alcanzados post segunda dosis. Previamente, se han reportado resultados similares para una vacuna a subunidades, probada en terneros, usando un adyuvante catiónico liposomal (CAF01) y un cóctel de proteínas recombinantes de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* [123]. Los autores observaron que la aplicación de la segunda dosis de la vacuna indujo una fuerte producción de anticuerpos específicos hacia los cinco antígenos de la vacuna, mientras que la aplicación de una tercera dosis no tuvo efecto en el incremento de sus niveles [123]. En nuestro trabajo, también se observó que los animales en los grupos Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA e Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA presentaron niveles de IgG en suero que permanecieron más altos que los controles durante un mes, después de aplicada la tercera dosis. Por el contrario, los niveles de anticuerpos en los grupos Lip+rFnBPA/rClfA y ODN-CpG+rFnBPA/rClfA disminuyeron hasta alcanzar niveles cercanos a los preinmunes en esa etapa. Aunque ningún grupo presentó anticuerpos específicos 270 días después de comenzado el plan

de inmunización, una única dosis, administrada a un año de completada la serie de 3 dosis (día 410), indujo un rápido aumento de los niveles de IgG específica en los animales de los grupos Lip+rFnBPA/rClfA, Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA e Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA, demostrando la capacidad de estas formulaciones de inducir memoria inmunológica.

Asimismo, se evaluaron los niveles de IgG1 e IgG2 presentes en las muestras. Estos subtipos se estudiaron debido a su capacidad opsónica y a sus diferencias en cuanto a su disponibilidad. Mientras que el subtipo IgG1 es transportado selectivamente desde circulación a secreción láctea en condiciones normales, el subtipo IgG2 es transportado unido a los neutrófilos durante la diapédesis producida cuando ocurre un proceso infeccioso en la glándula mamaria [124]. Los ensayos realizados demostraron que todos los grupos experimentales presentaban IgG1 específica para cada antígeno en los sueros obtenidos a los 15 días de administradas la segunda y cuarta dosis. Sin embargo, en el caso de la IgG2 específica para ambas proteínas, solo se detectaron altos niveles en los animales inmunizados con Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA después de administrada la cuarta dosis. La diferencia encontrada para este grupo, entre la casi nula producción de IgG2 producida luego de la tercera dosis y su incremento luego de la cuarta, podría deberse a la diferencia en la edad de los animales, ya que algunos autores sugieren que los niveles de IgG2 podrían aumentar conforme el ganado crece [125]. Además, la dispersión observada entre animales, en los niveles de IgG2 específica, podría explicarse por una variabilidad interindividual en la capacidad de responder al estímulo del ODN-CpG, característica de las poblaciones exogámicas, lo que sugiere que la sensibilidad a este inmunoestimulante podría estar parcialmente controlada por la genética del individuo [126,127]. Por otro lado, teniendo en cuenta que en los días 60 y 425, en los grupos Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA e Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA, se detectaron niveles similares de IgG, a pesar de existir diferencias en los niveles de los subtipos IgG1 e IgG2, no se puede descartar la contribución de otra subclase. Sin embargo, existe una falta de consenso entre los autores en la identificación de otras subclases de IgG bovina, además de IgG1 e IgG2 y, en consecuencia, una falta de reactivos disponibles comercialmente para su determinación [128–130].

Luego de administrado el refuerzo pre-parto, los animales del grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA presentaron un rápido aumento, en suero, de los niveles de IgG específica para rFnBPA y rClfA. Los niveles de IgG alcanzados por esta formulación se mantuvieron elevados durante el período de parto y hasta, al menos, 45 días después de la administración del refuerzo, correspondientes a 3 semanas post-parto. Aunque se contó con un número reducido de animales en esta etapa, se deben resaltar estos resultados, ya que sugieren que un único refuerzo, aproximadamente 21 días antes del parto, sería suficiente para aumentar rápidamente los niveles específicos de IgG en suero en un período de alta susceptibilidad a las infecciones intramamarias [124]. Con respecto a las subclases de IgG en este punto, la formulación Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA indujo un incremento significativo en el nivel de IgG1 específico para

ambos antígenos y una tendencia a una mayor producción de IgG2, siendo este aumento significativo para rClfA. Asimismo, los resultados del ensayo *in vitro* de capacidad de bloqueo, demostraron que las formulaciones liposomales serían eficientes en la inducción de anticuerpos capaces de inhibir la unión de *S. aureus* al Fb bovino, mientras que los anticuerpos inducidos por la formulación Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA no bloquearon esta unión. Esto resulta de gran interés, ya que estos anticuerpos podrían ser capaces de inhibir su adhesión celular, cuando ésta es mediada por mecanismos que involucren la formación de un puente de Fb [18].

Respecto a la presencia de anticuerpos en leche luego de aplicado el refuerzo pre-parto, se observó una tendencia a alcanzar mayores niveles de IgG en el grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA, incluso pasadas tres semanas del parto. En estas muestras, se observaron altos niveles de IgG1 y ausencia de IgG2. En concordancia con este resultado, se ha reportado que la concentración de IgG2 es extremadamente baja en leche proveniente de glándulas mamarias sanas [131]. Sin embargo, este subtipo se considera la principal opsonina capaz de favorecer la fagocitosis mediada por neutrófilos en la glándula mamaria infectada [124,132]. Existe evidencia que demuestra que en las primeras 4 horas de desarrollada la infección intramamaria, se produce un transporte masivo de IgG2 de sangre a leche. De esta forma, se incrementa la actividad opsonica en leche durante la fase aguda de la inflamación mamaria, produciéndose un aumento de la IgG2 en leche 6-12 horas antes de que se produzca el pico de la respuesta mediada por neutrófilos [124]. En este primer ensayo, si bien no se detectó IgG2 en leche, la presencia de este subtipo en el suero de los animales del grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA, sugiere que, en condiciones inflamatorias, estos animales podrían presentar un aumento en su capacidad fagocítica y eliminación bacteriana en la glándula mamaria. Sin embargo, el posible paso de esta subclase a leche y su contribución en el control de la infección deben ser evaluados mediante un desafío experimental. Cabe aclarar, que la falta de un análisis estadístico adecuado en la mayoría de las determinaciones realizadas al refuerzo pre-parto, se debe al reducido número de animales que pudo ser incluido en esta etapa, resultado de diversos factores propios de estudios de extensa duración como este [92].

Los resultados obtenidos demuestran que es posible utilizar un ODN-CpG con enlaces naturales, combinado con liposomas, en la formulación de vacunas para el ganado bovino. La utilización del liposoma como vehículo le brindaría una protección al ODN-CpG contra el efecto de ADNasas, permitiendo utilizar un oligonucleótido natural sin perder el efecto inmunoestimulante, como se ha demostrado previamente en ratones [68,120]. Se debe agregar, además, que no se observaron efectos adversos en los animales inmunizados con esta formulación a lo largo de todo el protocolo. En conjunto, el adyuvante formulado con liposomas catiónicos con ODN-CpG, demostró ser capaz de estimular la respuesta inmune humoral en niveles semejantes a los alcanzados por un adyuvante comercial, pero con una mejor producción de IgG2 y un bloqueo eficiente de la unión de *S. aureus* a Fb. Por estos motivos, se escogió continuar con

la evaluación del adyuvante Lip+ODN-CpG en el plan de inmunización aplicado a vaquillonas y vacas preñadas.

De la respuesta inmune generada en vaquillonas y vacas preñadas.

En esta segunda etapa, se evaluó la respuesta inmune humoral generada en vaquillonas y vacas preñadas inmunizadas con 4 antígenos recombinantes, rFnBPA, rClfA, α -toxina y r β -toxina, formulados con el adyuvante Lip+ODN-CpG, seleccionado sobre la base de los resultados obtenidos en terneras. A la par, un grupo de animales se asignó al grupo control, el cuál permaneció sin inmunizar a lo largo de todo el ensayo.

La mayoría de las vacunas experimentales o ensayos a campo que buscan el control de la mastitis causada por *S. aureus* en bovinos, han sido realizados con ganado preñado o en lactancia [115]. En esta etapa, el plan de inmunización se aplicó a animales preñados, implementado un esquema semejante a los utilizados por otros autores [93–95]. Las vaquillonas y vacas preñadas, pertenecientes al grupo tratado, fueron inmunizadas con 2 dosis de Lip+ODN-CpG+Rec a los 45 y 15 días previos a la fecha estimada de parto. Si bien esta formulación consiguió inducir una respuesta humoral en suero, específica contra los 4 antígenos, desde la administración de la primera dosis, se observó que la administración de la segunda dosis contribuyó al aumento de los niveles de IgG, alcanzándose su pico máximo al momento del parto, considerado el momento de mayor susceptibilidad a las infecciones intramamarias [124]. Este mismo efecto, ante la aplicación de una segunda dosis, ha sido observado por otros autores que han probado la vacuna comercial STARTVAC® [99]. Como se mostró en los resultados, los animales del grupo Lip+ODN-CpG+Rec mantuvieron niveles de IgG específica elevados hasta, al menos, 1 mes post-parto, mientras que en el grupo control no se detectaron variaciones de los niveles de esta inmunoglobulina a lo largo de todo el protocolo. Estos resultados coinciden con un trabajo previo de nuestro grupo, dónde se observó que una vacuna a subunidad que contenía los antígenos r β -toxina, rFnBPA y rClfA, formulados con un complejo inmunoestimulante (ISCOM-Matrix, Isconova), fue altamente inmunogénica al administrarse en dos dosis a vaquillonas preñadas, lo que desencadenó una respuesta humoral alta durante el primer mes después del parto [110]. Asimismo, otro ensayo realizado por nuestro grupo, demostró que al administrar una formulación que contenía los mismos antígenos recombinantes, junto a un lisado de *S. aureus* Reynolds y el adyuvante ISCOM-Matrix, siguiendo el mismo plan de inmunización, se conseguía inducir una respuesta inmune humoral con altos niveles de anticuerpos específicos. La cinética de la respuesta observada fue semejante a la encontrada en la presente tesis, alcanzando el pico máximo de anticuerpos al momento del parto, manteniéndose elevados estos niveles hasta pasado 1 mes [28]. Se debe resaltar, que éste representa el primer reporte de esta α -toxina recombinante como antígeno prototípico para una vacuna a subunidades para bovinos, demostrándose su potencial como inmunógeno. Existe un reporte previo de una vacuna experimental en bovinos, que incluyó

entre los antígenos un α -toxóide de *S. aureus*, lográndose inducir una respuesta inmune humoral específica, en suero, luego de una segunda dosis, semejante a la observada en la presente tesis [133].

Respecto a las subclases de IgG inducidas por la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, se observó una producción de IgG1 e IgG2 específicas aumentada en suero, respecto al grupo control, al momento del parto. Para los cuatro antígenos, los niveles de IgG1 específica resultaron mayores a los alcanzados por la IgG2, demostrando una predominancia del primer subtipo. Resultados previos, obtenidos por otros autores, demostraron que mediante un plan de inmunización al pre-parto, la vacuna comercial STARTVAC[®], induce una fuerte producción de IgG1 específica contra la cepa de *S. aureus* incorporada en la formulación, sin un aumento de la producción de IgG2 respecto al grupo control [99]. Como contraparte, la vacuna Lysigin[®] al ser administrada en bovinos, utilizando un plan de inmunización al pre-parto, indujo un aumento de IgG1 e IgG2 específica contra las 3 cepas incluidas en la formulación respecto al grupo control [94]. Una respuesta balanceada, entre los dos subtipos, también fue encontrada por nuestro grupo de trabajo, al evaluar, en vaquillonas embarazadas, una vacuna a subunidad que contenía tres de los antígenos incorporados en la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, r β -toxina, rFnBPA y rClfA [110].

Posteriormente, se estudió la capacidad de los anticuerpos generados con el plan de inmunización, de inhibir la actividad hemolítica de las toxinas nativas, α -toxina y β -toxina de *S. aureus*. Se observó que la formulación Lip+ODN-CpG+Rec fue capaz de generar una respuesta inmune humoral capaz de reducir significativamente la capacidad de hemólisis de la α -toxina, observándose una tendencia similar para la β -toxina. Además, se demostró que esta disminución de la actividad hemolítica, estaría correlacionada con el aumento de los niveles de inmunoglobulinas específicas contra las toxinas recombinantes utilizadas en la formulación. Hasta donde conocemos, la capacidad de los anticuerpos específicos, generados en bovinos, contra la α -toxina de reconocer y bloquear la actividad hemolítica de la toxina nativa, fue evaluada por primera vez en el presente estudio. Sin embargo, este factor de virulencia ha sido el *target* de numerosas pruebas en otras especies. Por ejemplo, una vacuna a subunidades probada en humanos, que incluyó un α -toxóide recombinante indujo la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de inhibir la lisis de glóbulos rojos de conejo mediada por la toxina nativa [134]. Resultados semejantes fueron observados en un estudio de inmunización realizado en conejos por otros autores [135]. Asimismo, existen diversos reportes de la evaluación de moléculas inhibitoras y anticuerpos monoclonales, con la finalidad de inhibir la actividad de la α -toxina de *S. aureus*, demostrando un consenso entre los autores en la necesidad de controlar este factor de virulencia [136–138]. A diferencia de lo que ocurre con α -toxina, y a pesar de la alta prevalencia de β -toxina en cepas de *S. aureus* causantes de mastitis clínicas, existen pocos estudios que tengan por finalidad inhibir su actividad [138]. En nuestro conocimiento, el único

estudio previo que evaluó la inducción de anticuerpos específicos en bovinos capaces de inhibir la actividad de β -toxina, fue realizado por nuestro grupo. En este estudio, un grupo de vaquillonas preñadas fue inmunizado con un inmunógeno experimental que contenía la r β -toxina, utilizada en la presente tesis, demostrándose que los anticuerpos específicos generados eran capaces de bloquear la actividad hemolítica de la β -toxina nativa [28]. Por otro lado, se ha encontrado un reporte de la obtención de un anticuerpo de dominio simple anti- β -toxina, seleccionado utilizando como antígeno la proteína nativa obtenida de un aislado de *S. aureus* de un caso confirmado de mastitis bovina, capaz de inhibir la actividad hemolítica de este factor de virulencia. Los autores sostienen que este anticuerpo neutralizante podría utilizarse como tratamiento para disminuir o prevenir el daño causado por la β -toxina durante la infección [139]. Finalmente, al evaluar los datos obtenidos en el ensayo de inhibición en el presente trabajo, en conjunto con los niveles de anticuerpos, se observó que en la mayoría de los animales del grupo control, que presentaron una alta inhibición de la actividad hemolítica, se detectaron niveles aumentados de anticuerpos específicos contra la toxina inhibida. Esto se encontraría asociado a la preexistencia de anticuerpos específicos contra las toxinas, posiblemente debido a la exposición natural de los animales a *S. aureus*. Estudios previos de otros autores, han demostrado la presencia, previa a la inmunización, de anticuerpos contra diversos antígenos de *S. aureus* [110,140,141].

Respecto a la presencia de anticuerpos en leche, en el grupo Lip+ODN-CpG+Rec se observó una tendencia al aumento en los niveles de IgG específica, principalmente anti-rFnBPA y anti-rClfA, al día 0. Sin embargo, a diferencia del protocolo aplicado en terneras, estos niveles decaen rápidamente alcanzando valores cercanos al grupo control a partir del día 15 post-parto. Estos resultados difieren de los encontrados previamente por nuestro grupo. En un ensayo previo, se demostró que, al administrar al pre-parto una formulación que contenía los antígenos recombinantes rFnBPA, rClfA y r β -toxina, junto a un lisado de *S. aureus* Reynolds y el adyuvante ISCOM-Matrix, se conseguía inducir un aumento en los niveles de IgG específica en leche contra los tres antígenos recombinantes por igual. Si bien los resultados demostraron una gran dispersión en la respuesta entre animales, el grupo que recibió esta formulación mantuvo niveles elevados de anticuerpos específicos, al menos, hasta el día 21 post-parto [28]. Resultados semejantes fueron encontrados al evaluar una formulación que contenía sólo antígenos recombinantes como inmunógeno formulados con el adyuvante ISCOM-Matrix [110]. Por otro lado, otros autores, han reportado diferencias en los niveles de IgG en leche contra distintos componentes del inmunógeno. Por ejemplo, en un estudio donde se caracterizó la respuesta inmune humoral inducida por la vacuna comercial Lysigin[®], los autores observaron un aumento en los niveles de IgG específica en leche, luego de la segunda dosis, sólo para dos de las 3 cepas incorporadas en la vacuna, a pesar de haberse detectado en suero anticuerpos elevados contra todas ellas [94]. Asimismo, un ensayo realizado en vacas en lactancia que fueron inmunizadas con dos dosis subcutáneas de una vacuna formulada con dos antígenos recombinantes de *S. aureus* y un

adyuvante de tipo aceite en agua combinado con un hidrogel de alginato, resultó en títulos de anticuerpos mayores para uno de los dos antígenos. En este estudio, los autores determinaron los títulos de los subtipos IgG en leche para ambos antígenos, obteniéndose para uno de ellos un título medio de IgG1 cercano a 7,5 y para otro de 500 [141]. En la presente tesis, la medición de los niveles de IgG en leche se realizó a una dilución fija de 1/100, existiendo así posibilidad de no haber detectado anticuerpos específicos en muestras que podrían tener títulos inferiores.

Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la respuesta inducida por una vacuna que contenga antígenos recombinantes *S. aureus* formulados con el adyuvante Lip+ODN-CpG, sería dependiente del plan de inmunización utilizado. Así, se observó que la implementación de un plan de inmunización desde edades tempranas podría presentar una mejora en los niveles alcanzados de IgG2 específica en suero, así como en los niveles de anticuerpos en leche, respecto a la tradicional inmunización al pre-parto. Hasta dónde llega nuestro conocimiento, este sería el primer reporte de un estudio que compara la respuesta inmune humoral inducida por una misma formulación, administrada desde edades tempranas o al pre-parto. Sin embargo, se ha demostrado previamente que la eficacia de una vacuna puede depender de esto, como es el caso de la vacuna comercial Lysigin[®], para la cual los fabricantes proponen un esquema de 2 dosis, distanciadas 15 días, a los 6 meses de edad, seguido de refuerzos sucesivos cada 6 meses hasta el parto. En un estudio en el que se siguió este esquema, la vacunación condujo a una reducción del 45% en el número de nuevos casos de infecciones intramamarias causadas por *S. aureus*, durante la preñez y el parto, y en una reducción del 30% en la aparición de nuevos casos crónicos respecto al grupo control [92]. Sin embargo, la administración de la misma vacuna en vaquillonas primíparas, si bien redujo la severidad y duración de las mastitis clínicas respecto a los controles, no fue capaz de prevenir el desarrollo de nuevas infecciones intramamarias [93]. Algunos autores sugieren que esta diferencia en la respuesta obtenida en distintas etapas de la vida del animal, puede ser explicada por la presencia de una inmunidad preexistente contra *S. aureus* al primer parto, debido a la exposición natural a este patógeno durante la cría del animal [109]. En concordancia, distintos trabajos han informado niveles detectables de anticuerpos específicos contra diferentes antígenos de *S. aureus* en terneros, por exposición natural, desde los 3-6 meses de edad [109,140]. Considerando que la respuesta inmune generada en este contexto parece no ser protectora, ya que la infección por *S. aureus* no protege contra infecciones posteriores, los autores sostienen que la inmunización de animales ya expuestos al patógeno podría conducir a un incremento de la respuesta inmune preexistente, con el mismo perfil efector generado ante la primera exposición, en lugar de inducir una respuesta inmune protectora [109]. Si bien se requiere de la realización de estudios posteriores de eficacia, los resultados obtenidos en la presente tesis, en conjunto con estos antecedentes, permiten sugerir a la vacunación desde edad temprana, seguida de un refuerzo antes de cada parto, como un complemento útil para controlar el surgimiento de nuevos casos de mastitis estafilocócica en el tambo.

CONCLUSIONES

En este primer capítulo se estudió la respuesta inmune inducida en bovinos por una vacuna prototípica a subunidades contra *S. aureus*, formulada con un adyuvante liposomal complementado con un ODN-CpG, como inmunoestimulante.

Respecto a la inoculación de terneras con las proteínas recombinantes de *S. aureus*, rFnBPA y rClfA, se logró inducir una respuesta inmune humoral específica, sin producir efectos adversos en los animales. Si bien las formulaciones Lip+rFnBPA/rClfA y ODN-CpG+rFnBPA/rClfA no fueron capaces de inducir una respuesta humoral con altos niveles de anticuerpos, la utilización conjunta de liposomas y ODN-CpG, en la formulación Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA, generó, a lo largo del protocolo, niveles de IgG tan altos como los alcanzados por un adyuvante comercial, Al(OH)₃+rFnBPA/rClfA. Asimismo, esta formulación liposomal demostró generar memoria inmunológica en los animales inmunizados, permitiendo la aplicación de un único refuerzo previo al parto, capaz de mantener altos niveles de anticuerpos a lo largo del período de mayor susceptibilidad a las infecciones intramamarias. Según el análisis de los subtipos de IgG, si bien todas las formulaciones experimentales fueron capaces de estimular la producción de IgG1 específica para los antígenos evaluados, sólo la formulación Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA fue capaz de inducir, en una instancia post-refuerzo la producción de IgG2 en un 50% de los animales evaluados. Luego del refuerzo pre-parto, la formulación Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA generó un rápido aumento de los niveles de IgG específicas en suero para ambas proteínas, alcanzando altos niveles de anticuerpos que se mantuvieron, incluso, hasta pasadas 3 semanas del parto. En esta etapa, al igual que para el refuerzo anual, se observó una estimulación de la producción de IgG1 en todos los grupos experimentales, mientras que sólo en 2 de los 4 animales del grupo Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA se observó un aumento en la producción de IgG2 específica para ambas proteínas. Respecto a la respuesta humoral en leche, se encontró que todos los grupos experimentales presentaron IgG específica para ambas proteínas. Sin embargo, la formulación Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA demostró una tendencia a generar los mayores niveles tanto de IgG como de IgG1 específica en estas muestras. La presencia del subtipo IgG2 no fue detectada en las muestras de suero de leche de ningún grupo experimental. Por último, al estudiarse la funcionalidad de los anticuerpos generados luego del refuerzo pre-parto, se observó que la respuesta humoral inducida en los animales inoculados con las formulaciones Lip+rFnBPA/rClfA y Lip+ODN-CpG+rFnBPA/rClfA podría disminuir la unión de *S. aureus* a Fb. En esta primera etapa, se pudo concluir que la inmunización con proteínas recombinantes formuladas con un adyuvante basado en liposomas catiónicos y un ODN-CpG, es un método viable para la inducción de una fuerte respuesta inmune humoral, con producción de IgG2 específica y generación de una respuesta inmune de memoria. Esto permitió seleccionar este

adyuvante para su evaluación en vaquillonas y vacas preñadas, en un plan de inmunización aplicado en la etapa tardía de gestación.

En cuanto al plan de inmunización realizado al pre-parto, se concluye que la administración de la formulación Lip+ODN-CpG+Rec induce una respuesta inmune humoral específica hacia los 4 antígenos evaluados, rFnBPA, rClfA, α -toxina y β -toxina. Si bien una única dosis fue capaz de inducir la producción de IgG específica, la administración de la segunda dosis resultó en un aumento de los niveles de estos anticuerpos en suero, permaneciendo elevados hasta 30 días post-parto. Al observar los subtipos de IgG inducidos en sangre, se observó un aumento en los niveles de ambos, IgG1 e IgG2, en el grupo tratado, sin embargo, para los 4 antígenos se observó una predominancia del subtipo IgG1. Respecto a los niveles de IgG específicos encontrados en leche, si bien en los animales del grupo Lip+ODN-CpG+Rec se detectó una tendencia hacia mayores niveles al momento del parto, estos no permanecieron estables en el tiempo, alcanzando valores cercanos al grupo control desde el día 15 post-parto. Los niveles de anticuerpos en leche resultaron demasiado bajos, por lo que no se realizó el estudio de los subtipos de IgG en estas muestras. Finalmente, se evaluó la funcionalidad de los anticuerpos obtenidos, demostrándose que la respuesta humoral lograda por la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, sería capaz de inhibir la actividad hemolítica de la α -toxina nativa de *S. aureus*. Una tendencia semejante fue observada en este grupo al evaluarse la inhibición de la actividad de β -toxina. Se debe resaltar que éste representa el primer reporte de la utilización de esta α -toxina como antígeno en una vacuna a subunidades, pudiéndose demostrar su potencial como inmunógeno para ser incluido en una formulación final.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente capítulo permiten concluir, por un lado, que es posible inducir una respuesta inmune humoral específica en bovinos, a partir de la administración de una vacuna a subunidades basada en antígenos recombinantes y, como adyuvante, liposomas catiónicos suplementados con un oligonucleótido natural con motivos CpG no metilados. Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten sugerir la implementación de planes de vacunación que comiencen a temprana edad, seguida de múltiples inmunizaciones antes del parto, como una herramienta que podría resultar exitosa en la búsqueda de una nueva vacuna, capaz de reducir la incidencia de las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus*.

CAPÍTULO 2

Estudio de la capacidad de nuevas formulaciones liposomales cargadas con distintos inmunoestimulantes para actuar como vehículo y adyuvante.

INTRODUCCIÓN

El rol de los inmunoestimulantes en el surgimiento de la nueva generación de adyuvantes.

Ya casi un siglo ha pasado de la implementación del primer adyuvante en una vacuna para uso humano, y a pesar de que muchos adyuvantes han sido probados para este uso, solo unos pocos tienen licencia hoy. Gran parte del trabajo inicial en el descubrimiento y desarrollo de adyuvantes fue empírico, produciendo productos seguros y efectivos, pero sin una comprensión clara de cómo funcionaban. Sin embargo, en las últimas décadas, el aumento de información disponible sobre el funcionamiento del sistema inmune innato y su importancia para iniciar y configurar la respuesta inmune adaptativa han conducido a una nueva generación de adyuvantes con un diseño y desarrollo racional basado en estos conceptos [142].

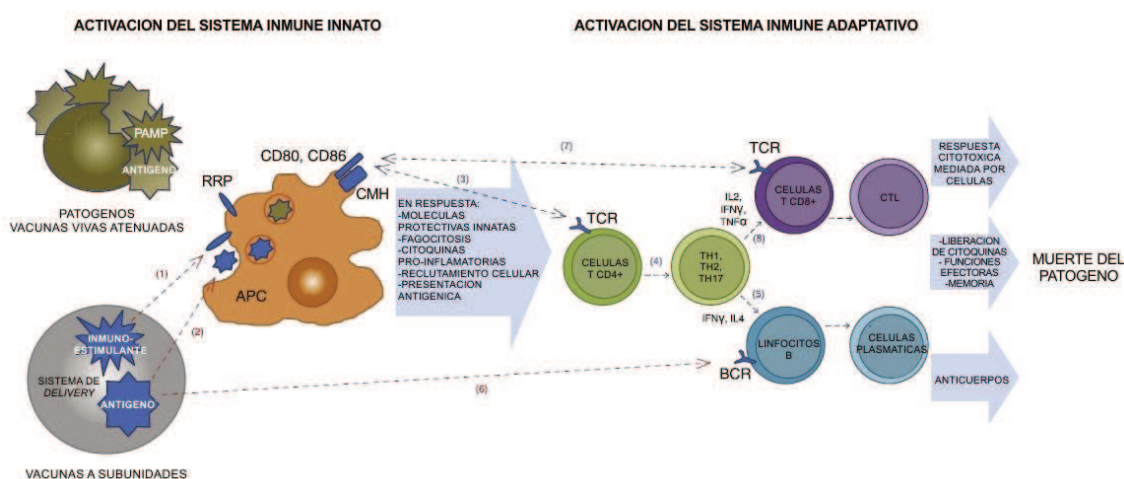


Fig. 19: Activación del sistema inmune por vacunas a subunidades formuladas con un sistema de *delivery* e inmunoestimulantes. El sistema de *delivery* sitúa al antígeno y al inmunoestimulante frente a una APC. ¹El inmunoestimulante activa directamente a la APC a través de su reconocimiento por un RRP. Esta activación conduce en la APC a un aumento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y secreción de moléculas protectoras innatas y citoquinas proinflamatorias que reclutan otras células inmunes. ²Los antígenos del patógeno proporcionan los epitopes específicos que son procesados y presentados por la APC a los linfocitos T CD4+ virgenes, ³a través del CMH de clase II. ⁴Los linfocitos T CD4+ que reconocen el epitope, experimentan expansión clonal y diferenciación a distintos perfiles de Th y ⁵proporcionan ayuda a los linfocitos B específicos, ⁶que también pueden unirse directamente al antígeno por sus inmunoglobulinas de superficie, dando lugar al cambio de isotipo y a su conversión a células plasmáticas secretoras de anticuerpos antígeno específicos. Al mismo tiempo, también se generan linfocitos B de memoria que, tras una exposición secundaria al antígeno, proliferan fácilmente y se diferencian en células plasmáticas. ⁷Las APC activadas también pueden interactuar directamente con los linfocitos T CD8+ que reconocen los epitopes presentados por el CMH de clase I, ⁸mientras los linfocitos Th le brindan señales coestimuladoras que permiten su diferenciación a linfocitos T citotóxicos efectores (CTL). Imagen adaptada de [144].

Los inmunoestimulantes son sustancias que inducen la activación o incrementan la actividad del sistema inmune, principalmente a través de su unión a RRP presentes en células de

la respuesta inmune innata. Se considera que la potencia de las vacunas basadas en organismos completos se debe, al menos en parte, a la estimulación de los TLR. Por ejemplo, se ha demostrado que la vacuna contra la fiebre amarilla, que se basa en un virus vivo atenuado, interactúa con al menos cuatro TLR. Resultados semejantes se encontraron para vacunas como la BCG y la Influvac (influenza). Por esta razón, los agonistas de TLR y otros RRP son considerados inmunoestimulantes atractivos para su inclusión en adyuvantes que puedan incorporarse, por ejemplo, en vacunas formuladas con antígenos purificados incapaces de inducir una respuesta inmune efectiva por sí solos [142–144].

La mayoría de los adyuvantes de nueva generación incluidos en vacunas ya autorizadas o en desarrollo clínico se componen tanto de un sistema de *delivery* como de un inmunoestimulante (Fig. 19). La implementación de estos sistemas tiene varios beneficios claros: 1) estabilizar la formulación de la vacuna, ya que los inmunoestimulantes son, a menudo, inestables en solución acuosa; 2) brindar la localización conjunta del antígeno y el inmunoestimulante, asegurando la activación de la misma célula que ha encontrado el antígeno; 3) facilitar el contacto del inmunoestimulante con las células que presentan el RRP; 4) suministrar el inmunoestimulante en el compartimento de la célula donde se encuentra su RRP [143].

La combinación de inmunoestimulantes y sistemas de *delivery* puede mejorar la eficacia de las vacunas de diferentes maneras; como por ej., aumentando la respuesta inmune a los antígenos poco inmunogénicos o ineficaces en individuos inmunocomprometidos, induciendo una protección más prolongada, generando un tipo específico de respuesta inmune (en mucosas o mediada por células), direccionando la respuesta inmune hacia un perfil de linfocitos T específico (Th1, Th2 o Th17), mejorando la afinidad y avidéz de los anticuerpos, reduciendo la dosis de antígeno o el número de dosis necesarias para lograr una protección total [144]. Por lo tanto, es importante seleccionar tanto el sistema de *delivery* como los inmunoestimulantes apropiados, capaces de brindar las señales necesarias para activar la respuesta inmune adecuada para el control de las infecciones causadas por el patógeno blanco, una vez que la vacuna es administrada.

ODN-CpG, un inmunoestimulante capaz de inducir una respuesta Th1

El ADN bacteriano es un tipo de PAMP capaz de activar el sistema inmune innato. Su capacidad inmunoestimulante depende de la existencia de motivos CpG (Citosina – fosfato – Guanina) no metilados en su secuencia, presentes en alta frecuencia en el ADN procariota. Si bien en el ADN de mamíferos también se hallan dinucleótidos CpG, su frecuencia es menor y mayoritariamente se encuentran metilados. Esta diferencia permite que, durante un proceso infeccioso, las células que expresen el receptor TLR-9 y sean expuestas a la liberación de ADN bacteriano, reconozcan los motivos CpG no metilados y disparen una respuesta inmune protectora, que incremente la capacidad del huésped de eliminar el patógeno [44,145,146].

Las características propias del ADN bacteriano lo vuelven capaz de activar directamente tanto a células dendríticas, como a linfocitos B, contribuyendo a la inducción de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. A partir de la endocitosis de estos PAMP y su posterior unión al TLR9 se produce una cascada inmunoestimuladora que incluye la maduración, diferenciación y proliferación de linfocitos B y T, células Natural Killer, monocitos, macrófagos y células dendríticas. En conjunto, estas células secretan citoquinas y quemoquinas tanto proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-18 y TNF- α) como estimuladoras del perfil Th1 (IFN- γ e IL-12) [147]. La capacidad inmunoestimulante del ADN bacteriano puede ser imitada mediante la utilización de oligodesoxinucleótidos sintéticos que presenten motivos CpG no metilados (ODNs-CpG) (Fig. 20).

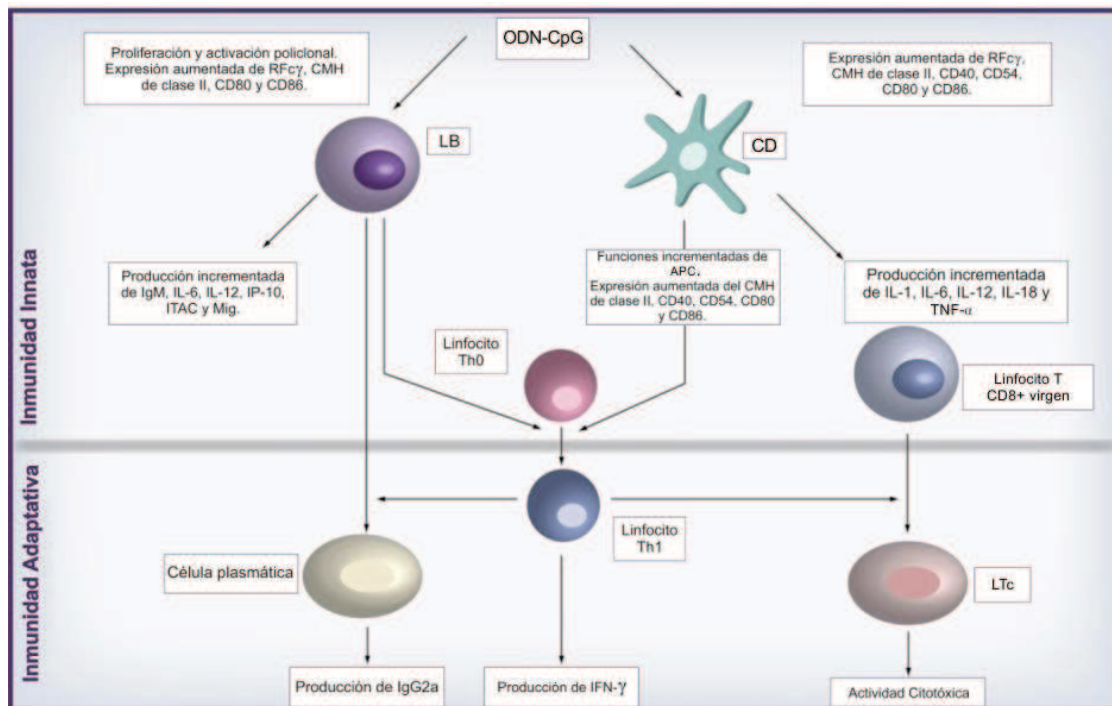


Fig. 20: Mecanismo por el que los ODN-CpG estimulan la respuesta inmune innata y adaptativa. Los ODN-CpG activan directamente a las células dendríticas y linfocitos B, mediante su unión al TLR9 presente en el endosoma de estas células. La respuesta inmune resultante se caracteriza por la producción de citoquinas proinflamatorias y citoquinas asociadas al perfil Th1, así como de inmunoglobulinas polirreactivas. Al mejorar la función de las APC, los ODN-CpG facilitan la generación de respuestas inmunes adaptativas humorales y celulares contra antígenos vacunales coadministrados.

LB: linfocito B; CD: célula dendrítica; LTc: linfocito Tc.
 Imagen adaptada de [145].

Se ha demostrado que la adición de ODN-CpG a un antígeno proteico, mejora la producción de anticuerpos hacia este último. Sin embargo, es necesario prolongar la biodisponibilidad y duración de la acción del ODN, ya que, incluso utilizando oligonucleótidos resistentes a nucleasas, su vida media *in vivo* no supera los sesenta minutos, debido a su rápida eliminación por adsorción a proteínas séricas. Un método potencial para protegerlos, aumentar su

vida media e incrementar su captación por las células del sistema inmune, involucra encapsularlos en liposomas [68,148]. A su vez, el antígeno y el ODN-CpG deben estar colocalizados en la misma APC para generar una respuesta inmune antígeno específica más potente, por lo que la utilización de un adyuvante que los co-transporte es una estrategia que puede incrementar la posibilidad de que la respuesta sea potenciada [149,150]. Trabajos previos demostraron que la combinación de liposomas con CpG permite obtener respuestas más potentes que con ambos adyuvantes por separado y con una marcada tendencia a un perfil Th1 [68].

Los ODN-CpG comerciales y más utilizados en la formulación de vacunas son sintetizados con enlaces fosforotioato resistentes a la acción de nucleasas, de manera de prologar su vida media *in vivo*. Sin embargo, existen reportes que asocian el uso de estos enlaces modificados con efectos secundarios adversos a largo plazo en ratones y primates como, por ejemplo, inducción de artritis, destrucción de folículos linfoides, producción de IgM específica anti-ODN-CpG, falla renal, entre otras [120,151]. Asimismo, Haas y col. han reportado que existen diferencias en la interacción con TLR9, asociadas a las características del esqueleto del oligonucleótido. En este trabajo, los autores demostraron que en oligonucleótidos con enlaces fosfodiéster el efecto agonista de TLR9 se debe no sólo a la presencia de motivos CpG sino al esqueleto mismo, ya que, al utilizar el esqueleto del oligonucleótido libre de bases, éste es capaz de generar un estímulo basal. Este estímulo basal se vio incrementado al incluir las bases al esqueleto, aún en ausencia de motivos CpG, mientras que la adición de estos últimos resultó en el mayor estímulo de TLR9. Por su parte, al evaluar la secuencia con enlaces fosforotioato encontraron que el esqueleto genera un efecto antagonista tanto de TLR9 como de TLR7, efecto que se mantiene al agregar las bases y que requiere, inexorablemente, de la adición de motivos CpG para revertirlo y generar un efecto antagónico de TLR9 [152]. Considerando los posibles efectos adversos de los ODN-CpG con enlace fosforotioato, así como su incapacidad de imitar fielmente el mecanismo de acción de las secuencias CpG naturales, y el alto costo de los ODN-CpG modificados, para el desarrollo de la presente tesis se optó por el uso de una secuencia con enlace fosfodiéster.

El oligonucleótido utilizado en este trabajo fue sintetizado con la secuencia del ODN-CpG 1826, en este caso, sintetizado con enlaces naturales de tipo fosfodiéster. El uso de esta secuencia en ratones está ampliamente reportado en la bibliografía, conociéndose así su capacidad tanto de incrementar la respuesta inmune humoral hacia un antígeno vacunal como de inducir una respuesta celular, caracterizada principalmente por un perfil de tipo Th1 con producción de IFN- γ , lo que podría, a su vez, incrementar la respuesta mediada por linfocitos T CD8+ [145].

El receptor de manosa como target de un inmunoestimulante

El receptor de manosa (MR) (CD206) se expresa en distintas APC, incluyendo células dendríticas y macrófagos. El MR contiene múltiples dominios de unión a carbohidratos e

internaliza una variedad de glicoproteínas. El receptor se une a una gama de oligosacáridos con diferentes afinidades: D-manosa = L-fucosa >> D-N-acetilglucosamina \geq D-glucosa >> D-xilosa >>> galactosa. El tráfico intracelular del MR permite una captación de antígenos altamente eficiente. Después de la unión del ligando, el complejo se internaliza rápidamente en endosomas tempranos, donde los ligandos se disocian y el receptor se recicla rápidamente a la superficie celular. A su vez, el MR juega un rol importante en la fagocitosis de microorganismos no opsonizados que exponen glicoproteínas manosiladas [153].

Oligosacáridos como los mananos, los cuales están conformados por ramificaciones de manosa, pueden ser utilizados como inmunoestimulante debido a su capacidad para unirse a las lectinas de tipo C, como el MR y el DC-SIGN (CD209), presentes en las APC [154]. La utilización de mananos como inmunoestimulantes está ampliamente estudiada. Si bien su efectividad es principalmente atribuible a su capacidad para unirse a sus receptores, presentes en las APC, y mejorar el reconocimiento antigénico, también se ha informado que los mananos extraídos de levaduras serían capaces de inducir una fuerte respuesta citotóxica hacia antígenos proteicos, y de estimular tanto la respuesta celular como humoral específica. En ensayos *in vivo* se observó que tras la inmunización de ratones con antígenos manosilados fue posible inducir una respuesta de tipo Th1 con activación de la respuesta citotóxica [155,156]. Por lo tanto, la utilización de mananos como inmunoestimulante puede ser una estrategia atractiva considerando la necesidad de estimular una respuesta celular para el control efectivo de las infecciones causadas por *S. aureus*.

Alternativamente a la conjugación directa del antígeno a un manano, es posible optar por la inclusión de este inmunoestimulante en liposomas, el cual permitiría su co-transporte junto a cualquier antígeno de nuestra elección. Dado que el manano es un polisacárido extremadamente hidrofílico, es incapaz de recubrir la superficie liposomal por simple incubación. Por lo tanto, es necesaria la hidrofobización de este oligosacárido, mediante su conjugación con un ácido graso, dando lugar por ej. al O-palmitoilmanano (OPM). Esta modificación permite que, ante la incubación del OPM con liposomas pre-armados, se dé lugar a la interacción entre las colas lipídicas y la bicapa externa del liposoma, anclando el oligosacárido a la vesícula y dejándolo expuesto al exterior [157]. Mediante su incorporación en la superficie liposomal se busca que los liposomas sean captados por el MR. Este reconocimiento no sólo daría lugar a la maduración fenotípica y funcional de las células dendríticas, sino que también mejoraría la captación del antígeno presente en la formulación y por consiguiente su presentación [158,159].

Surfactantes aminoacídicos de tipo gemini, ¿una nueva generación de inmunoestimulantes?

Los surfactantes aminoacídicos (SAA) son lipopéptidos con características biocompatibles y biodegradables. Dentro de esta clasificación, se encuentran los SAA de tipo *gemini*. Estos están formados por dos unidades de lipopéptidos, cada una de ellas con una cabeza

de aminoácidos y una cadena hidrófoba. Estas subunidades son capaces de unirse, bajo ciertas condiciones, por una cadena espaciadora cercana a la región aminoacídica, dando lugar a un diacil lipopéptido, denominado *gemi*ni. Los *gemi*ni muestran un mejor rendimiento en comparación con sus contrapartes monoméricas y han atraído gran interés como agentes para el *delivery* controlado de drogas debido a su capacidad de interactuar con ácidos biliares, membranas fosfolipídicas, oligosacáridos y con la albúmina sérica [160].

Estructuralmente los SAA de tipo *gemi*ni presentan ciertas semejanzas con los lipopéptidos bacterianos. Estos últimos, son PAMPs presentes en la pared celular bacteriana y generalmente consisten en estructuras cortas de aminoácidos unidos a ácidos grasos a través de enlaces éster o amida. Las lipoproteínas de bacterias gram positivas contienen dos cadenas de ácidos grasos mientras que las provenientes de bacterias gram negativas contienen tres. Las cadenas de acilo son heterogéneas en términos de su longitud y grado de saturación, sin embargo, se encuentran con mayor frecuencia formados por ácido palmítico (que contiene 16 carbonos). En función del número de cadenas de acilo, estos lipopéptidos son reconocidos por distintos heterodímeros de TLR2. Así, los heterodímeros TLR1/2 permiten identificar lipoproteínas o lipopéptidos triacílicos, mientras que la heterodimerización con TLR6 está involucrada en la detección de diacil lipopéptidos. Además, la señalización a través de TLR2 solo también se ha informado para algunos lipopéptidos [161].

Si bien los SAA de tipo *gemi*ni han sido ampliamente probados como vehículo para mejorar la absorción de drogas o como agentes de transfección por su capacidad de englobar moléculas de ADN, poco se ha estudiado de ellos como posibles inmunoestimulantes [160]. Existen algunos reportes bibliográficos que señalan que la incorporación de *gemi*ni a liposomas puede mejorar la fusión con la membrana celular, la captación celular, la selectividad, la eficiencia de transfección, así como disminuir la toxicidad de la formulación [162].

En la presente tesis se evaluó como inmunoestimulante el SAA de tipo *gemi*ni, denominado AG2-C16. Este fue diseñado y sintetizado por el Laboratorio de Química Aplicada (LaQuimAp, FCB-UNL) y se caracteriza por ser un lipopéptido monomérico de bajo peso molecular. La región polar es un pentapéptido denominado AG2 de secuencia WWCOO (donde: W- triptófano, C- cisteína; O- ornitina), mientras que el N-terminal se encuentra hidrofobizado con una cadena de 16 carbonos (ácido palmítico) [163]. La cisteína presente en el pentapéptido permite que a pH fisiológico dos monómeros dimericen por la oxidación de los grupos sulfhidrilos presentes en este residuo, dando lugar a la formación de un enlace disulfuro y por consiguiente a una estructura de tipo *gemi*ni [160]. Por otro lado, las ornitinas incorporadas en la secuencia le brindan al monómero dos cargas positivas, siendo este entonces un lipopéptido catiónico. Esta característica resulta de especial interés en el diseño de adyuvantes liposomales, ya que se ha descrito que una carga positiva en su superficie beneficiaría el contacto con las APCs y por consiguiente mejoraría su capacidad adyuvante [64]. Cabe resaltar que el lipopéptido utilizado

está compuesto por aminoácidos y ácidos grasos naturales por lo que es 100% biocompatible y biodegradable.

La vía de administración, otro factor responsable de la respuesta inmune inducida por una vacuna.

La ruta de administración escogida puede influir en la respuesta inmune obtenida mediante un plan de inmunización, principalmente debido a los diferentes grados de perfusión tisular, de sangre y linfa, presente en los distintos tejidos. Las características del tejido pueden determinar si los componentes de una vacuna se eliminan por mecanismos de defensa innatos o si son llevados hasta órganos linfáticos secundarios para dar lugar a una respuesta inmune adaptativa [164]. Por ej., al compararse las rutas intradérmica e intramuscular para la misma vacuna contra la influenza estacional en una cohorte de personas mayores de 60 años, se demostró que la primera vía resultaba más inmunogénica que la segunda [165]. Estos antecedentes demuestran que una vía de administración inapropiada puede hacer a una vacuna potencialmente ineficaz [164].

Los conocimientos actuales sobre la estructura de la piel alientan a utilizar rutas como las intradérmica y transcutánea para la administración de vacunas. Los queratinocitos y células de Langerhans en la epidermis, así como los fibroblastos, células dendríticas y mastocitos en la dermis, contribuyen todos a la inmunocompetencia de la piel. Ante señales de peligro, los queratinocitos producen una amplia variedad de citoquinas, quemoquinas y péptidos antimicrobianos, que pueden activar a células dendríticas dérmicas y células de Langerhans [164,166]. Se ha documentado que la administración de antígenos vacunales a través de la piel, es capaz de generar una respuesta sistémica y en mucosas robusta con producción de IgG e IgA específicas. A su vez, ciertos autores han reportado que la inmunización transcutánea es capaz de inducir la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos [166]. Por estos motivos, las vías intradérmica y transdérmica pueden presentar una ventaja a la hora de diseñar una vacuna para el control de las infecciones causadas por *S. aureus*.

Por otro lado, el diseño de una vacuna libre de aguja podría potencialmente reducir el riesgo de enfermedades transmitidas por agujas, mejorar el acceso a la vacunación mediante la simplificación de los procedimientos ya que no se requeriría de personal capacitado, y ayudar en la implementación de regímenes de múltiples vacunas gracias a la reducción del dolor, la evitación de casos de fobia a las agujas y por consiguiente el aumento en el cumplimiento de los pacientes, lo que podría resolver un objetivo importante en la atención sanitaria mundial [166,167].

Sosteniendo como hipótesis que el agregado de distintos inmunoestimulantes, así como la elección de una vía de aplicación adecuada, podrían inducir una respuesta inmune balanceada entre los perfiles Th1, Th2 y Th17, necesaria para el control efectivo de las infecciones

causadas por S. aureus, en el presente capítulo, se propuso estudiar diversos adyuvantes liposomales formulados individualmente con ODN-CpG, OPM o AG2-C16, así como con distintas combinaciones de ellos. Como antígeno modelo en estas formulaciones se utilizó una proteína de superficie de S. aureus recombinante, rClfA.

Dentro de los estudios llevados a cabo, se realizó la caracterización estructural de las distintas formulaciones, así como el estudio de la capacidad de las distintas formulaciones para inducir una respuesta inmune eficiente en un modelo experimental murino. Así también, se evaluó la capacidad de las distintas formulaciones liposomales como vehículo y adyuvante en la administración transdérmica e intradérmica de vacunas.

OBJETIVOS

Objetivos específicos tratados en el presente capítulo:

3. Obtener diversas formulaciones liposomales complementadas con: ODN-CpG, O-palmitoil manano y/o SAA de tipo *Gemini*.
 - 3.1. Diseñar las distintas formulaciones liposomales con el agregado de los distintos inmunoestimulantes y ClfA recombinante (rClfA) de *S. aureus* como antígeno modelo.
 - 3.2. Caracterizar las formulaciones obtenidas.
4. Evaluar, en un modelo murino, la utilización de las formulaciones obtenidas como adyuvante en vacunas a subunidades contra un antígeno de *S. aureus*.
 - 4.1. Obtener las distintas formulaciones a evaluar, incluyendo al antígeno recombinante rClfA de *S. aureus* como antígeno modelo.
 - 4.2. Realizar un plan de inmunización en ratones.
 - 4.3. Caracterizar la respuesta inmune humoral y celular inducida por las distintas formulaciones.
5. Evaluar la capacidad de las diferentes formulaciones como vehículo de vacunas a subunidades administradas de forma tópica.
 - 5.1. Evaluar la capacidad de las formulaciones para transportar un colorante a través de Epidermis Murinas Reconstituidas (EMR).
 - 5.2. Evaluar la capacidad de las formulaciones de estimular queratinocitos y fibroblastos murinos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Obtener diversas formulaciones liposomales complementadas con: ODN-CpG, O-palmitoil manano y/o SAA de tipo *Gemini*.

3.1. Diseño de las distintas formulaciones liposomales con el agregado de los distintos inmunoestimulantes y rClfA recombinante de *S. aureus* como antígeno modelo.

3.1.1. Obtención de liposomas: Se obtuvieron liposomas (Lip) utilizando DPPC, colesterol y estearilamina por el método de inyección etanólica. Los tres componentes, en proporción 7:2:2 mol/mol, se disolvieron en una mezcla de etanol/isopropanol (1:1 v/v), esta mezcla se denominó fase orgánica. Por otro lado, se obtuvo una fase acuosa formada por buffer acetato de sodio 50 mM (BAC), pH 4,3. La fase orgánica fue incorporada por inyección a la fase acuosa en proporción 1:9 v/v, resultando una suspensión liposomal de concentración lipídica 8 mM [67,111,112].

3.1.2. Obtención del OPM: El OPM fue obtenido a partir de la conjugación de mananos de *Saccharomyces cerevisiae* y cloruro de palmitoílo. Para esto, 100 mg de mananos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fueron disueltos en 1 mL de dimetil formamida (DMF; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Por otro lado, 10,2 µl de cloruro de palmitoílo al 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se diluyeron en 1 mL de DMF. Inmediatamente se adicionó la solución de cloruro de palmitoílo a la solución de mananos. Se colocó el reactor en agitación y se llevó la mezcla a 60°C. Al alcanzar la temperatura se adicionaron 100 µl de piridina anhidra al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El reactor se dejó ON a 60°C y en agitación continua. La mezcla resultante se colocó en 100 mL de etanol absoluto, se agitó vigorosamente y se dejó precipitar ON a -20°C. El precipitado se recolectó por centrifugación y se lavó dos veces de esta misma manera, la primera con etanol absoluto y la segunda dietiléter. Luego del último lavado, el precipitado se dejó secar en estufa a 37°C para su posterior conservación [157]. A los fines de comprobar la conjugación y obtención del OPM se utilizó la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC) [168], la cual se aplicó al comienzo y el final del proceso. La detección de cambios en el perfil de corrida de la muestra a los distintos tiempos, permitió determinar cualitativamente el avance efectivo de la reacción, confirmando la adición de colas lipídicas a los mananos y por consiguiente su hidrofobización, al menos de forma parcial.

- 3.1.3. Obtención de SAA de tipo Gemini: El lipopéptido AG2-C16, empleado en los ensayos, fue diseñado y sintetizado por el grupo de investigación del Laboratorio de Química Aplicada (LaQuimAp), de la FBCB, UNL. La síntesis fue realizada en fase sólida mediante la química del 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc) [169].
- 3.1.4. Armado de liposomas con distintos inmunoestimulantes: Los liposomas previamente obtenidos, fueron mezclados volumen a volumen con los distintos inmunoestimulantes; ODN-CpG específico para murinos de secuencia 5'-tccatgacgttctgacgtt-3' [120] sintetizado con enlaces fosfodiéster por Invitrogen (Waltham, MA, USA), OPM y/o AG2-C16 diluidos en BAc, incluyéndose en esta fracción el antígeno rClfA cuando debía ser incorporado a la formulación. Las concentraciones finales de cada componente en las distintas formulaciones resultaron: Lip 4mM; ODN-CpG 7,5 nmol/ml; AG2-C16 400 μ M; OPM 2 mg/ml; rClfA 200 μ g/ml. Las distintas formulaciones obtenidas se incubaron a 4°C por 1 semana, realizándose una observación periódica de su estabilidad.
- 3.2. Caracterización de las formulaciones obtenidas.
- 3.2.1. Determinación de tamaños predominantes y potencial ζ (PZ): Una dilución de cada una de las muestras fue analizada mediante DLS (Dynamic Light Scattering) con el objetivo de determinar el tamaño predominante, así como la dispersión de tamaño de los liposomas en suspensión [112] y el PZ. Estas determinaciones se realizaron utilizando el equipo Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK).
- 3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET): Se colocaron 40 μ l de formulación sobre papel parafilm. Sobre la gota formada se colocó una rejilla porta muestra de cobre que se dejó en contacto con la muestra durante 15 segundos. Posteriormente se secó el exceso de muestra con papel absorbente y se colocó la rejilla en contacto con el agente de contraste, ácido túngstico, durante 7 minutos. Finalmente, la rejilla fue lavada con agua destilada, secada y colocada en el porta muestras del microscopio JEM 1010 (JEOL USA Inc., MA, USA) para realizar la adquisición de imágenes. A partir de las imágenes obtenidas se realizaron mediciones del diámetro de las membranas lipídicas. Este procedimiento fue realizado con cada una de las formulaciones obtenidas.
- 3.2.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB): Una gota de cada formulación evaluada fue sometida a criofijación por congelamiento mediante vapores de nitrógeno, utilizando el sistema CryoMEB (Leica Microsystems, Wetzlar, DEU). Posteriormente, se realizó la criofractura, sublimación (eliminación de cristales de agua) y metalización con platino de la muestra para obtener una superficie conductora. Completado el tratamiento de la muestra, esta se transfirió a la platina

del microscopio Thermo Scientific VolumeScope (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) para la adquisición de imágenes a -115°C .

3.2.4. Evaluación de la protección del ODN-CpG a la acción de ADNAsas: Dado que el ODN-CpG utilizado en los ensayos presenta sensibilidad a la acción de ADNAsas, se evaluó la protección a la degradación conferida por las formulaciones liposomales. Este ensayo se realizó utilizando la RQ1 ADNasa (Promega, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, $17\ \mu\text{l}$ de ODN-CpG $7,5\ \text{nmol/ml}$ libres o incorporados en liposomas, se incubaron con $2\ \mu\text{l}$ del *buffer* de reacción 10X específico de la enzima y $1\ \mu\text{l}$ de RQ1 ADNasa, durante 1 hora a 37°C . Luego, $1\ \mu\text{l}$ de solución *stop* de RQ1 ADNasa se agregó para terminar la reacción. Se tomaron $10\ \mu\text{l}$ de cada el tubo que fueron incubados a 65°C durante 10 minutos para completar la inactivación de la ADNasa (con choque térmico, cCT), mientras que los otros $10\ \mu\text{l}$ se mantuvieron a temperatura ambiente (sin choque térmico, sCT) de manera de evaluar el efecto del choque térmico en la estabilidad de la formulación. Las cuatro condiciones finales junto con tres controles sin tratamiento con ADNasa se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Los controles fueron: CpG-ODN $7,5\ \text{nmol/ml}$; Lip $4\ \text{mM}$ y Lip $4\ \text{mM}$ +ODN-CpG $7,5\ \text{nmol/ml}$.

4. Evaluar, en un modelo murino, la utilización de las formulaciones obtenidas como adyuvante en vacunas a subunidades contra un antígeno de *S. aureus*.

4.1. Obtener las distintas formulaciones a evaluar, incluyendo al antígeno rClfA de *S. aureus* como antígeno modelo.

4.1.1. Composición del inmunógeno experimental: Se obtuvo el antígeno recombinante, rClfA, a partir de clones previamente disponibles en el laboratorio [28,110]. El inmunógeno experimental consistió en $200\ \mu\text{g/ml}$ de este antígeno.

4.1.2. Formulación de los inmunógenos experimentales: A los efectos de evaluar la capacidad adyuvante y caracterizar la respuesta inmune inducida, se ensayaron los distintos sistemas adyuvantes obtenidos en el punto 3. Así, el inmunógeno experimental fue formulado en liposomas conteniendo, alternativamente, ODN-CpG, OPM, AG2-C16 o combinaciones de estos como inmunoestimulantes.

4.2. Realizar un plan de inmunización en ratones.

4.2.1. Animales experimentales, cronograma de vacunación y procedimiento de muestreo: En un primer ensayo se utilizaron 40 ratones de la cepa BALB/c, de 5 a 7 semanas de edad al comienzo del protocolo de inmunización, que fueron mantenidos en el bioterio del Laboratorio de Inmunología Experimental de la

FBCB-UNL, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con suministro de agua y alimento *ad libitum*. Los animales en los grupos experimentales fueron inoculados con las siguientes formulaciones: rClfA, Lip+ODN-CpG+rClfA, Lip+AG2-C16+rClfA, o Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA (n=5/grupo). Los grupos control recibieron las distintas formulaciones libres de rClfA. Los animales recibieron 2 dosis de las formulaciones, por vía intradérmica, una cada 3 semanas, de 50 µl de formulación (10 µg rClfA) y se sacrificaron a los 24 días de la segunda dosis. Se tomaron muestras de sangre por punción de la vena submandibular y muestras de lavados vaginales mediante lavados con PBS, de todos los animales antes de la aplicación de la primera dosis y a los 10 días de cada una de ellas. Los animales fueron sacrificados por sangrado bajo anestesia, como se describió previamente. A su vez, se realizaron lavados con PBS de la mucosa vaginal. Los sueros obtenidos de las muestras de sangre fueron conservados a -20°C hasta el momento de su utilización. Las muestras de lavado vaginal se centrifugaron para la obtención del sobrenadante y se les añadieron inhibidores de proteasas previo a su conservación a -80°C hasta su utilización.

En un segundo ensayo en la cepa BALB/c se utilizaron 40 ratones, de 5 a 7 semanas de edad al comienzo del protocolo de inmunización, que fueron mantenidos en la Plataforma de investigación experimental en biología y salud (Prebios) de la Universidad de Poitiers (Francia), con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con suministro de agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron inmunizados con las mismas formulaciones evaluadas en el primer ensayo. En este caso, se aplicaron 2 dosis por vía intradérmica, una cada 3 semanas, de 50 µl de formulación (10 µg rClfA) y se aplicó un refuerzo pre-sacrificio al cumplirse 10 días de la segunda dosis. Pasadas 72 hs de aplicado el refuerzo los animales fueron sacrificados por sangrado bajo anestesia, utilizando Ketamina-Xilacina a una dosis de 100 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. A su vez, durante el sacrificio se extrajeron los ganglios axilares y submandibulares. El suero obtenido de las muestras de sangre fue conservado a -20°C hasta el momento de su utilización, mientras que las células obtenidas de los ganglios se utilizaron inmediatamente para el estudio de las poblaciones celulares presentes en el sitio. Se tomaron muestras de sangre antes de la primera dosis para comprobar que los animales no presentaban anticuerpos específicos a-rClfA previos al comienzo del protocolo. Este mismo protocolo se repitió con 50 ratones de la cepa C57BL/6J añadiéndose 2 grupos experimentales; Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA (n=5/grupo).

- 4.3. Caracterizar la respuesta inmune humoral y celular inducida por las distintas formulaciones.

- 4.3.1. Determinación de anticuerpos específicos: La capacidad de las formulaciones de inducir la producción de anticuerpos específicos, fue evaluada por ELISA indirecto. En función de las muestras disponibles en cada ensayo, se determinaron los niveles de anticuerpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a (o IgG2c en muestras obtenidas de ratones de la cepa C57BL/6J) en suero, y de IgG e IgA, en las muestras de lavado vaginal recolectadas. Placas de poliestireno de 96 pocillos (GBO, Frickenhausen, DEU) fueron sensibilizadas con 0,5 µg/pocillo de rClfA. Posterior al bloqueo con leche de vaca descremada al 5% en PBS 1X, se colocaron las muestras de suero o de lavado vaginal en sus diluciones correspondientes. La unión de los anticuerpos específicos se evaluó mediante incubación con los anticuerpos anti-IgG (Jackson, Baltimore, MD, USA), anti-IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA), anti-IgG2a (Abcam Inc. Cambridge, MA, USA), anti-IgG2c (Abcam Inc. Cambridge, MA, USA) o anti-IgA (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) murino conjugados a peroxidasa. El revelado se realizó mediante la utilización de una solución de TMB (*ready-to-use*, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y la reacción de color se detuvo con H₂SO₄ 2N. La densidad óptica se midió a 450 nm usando un lector de microplacas (Multiskan EX, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Los resultados obtenidos para cada uno de los tiempos evaluados fueron comparados con los obtenidos para los sueros preinmunes y con los del grupo control.
- 4.3.2. Análisis de la respuesta celular local en ganglios drenantes: Se utilizaron las células totales provenientes de ganglios drenantes de ratones sacrificados a las 72hs del refuerzo pre-sacrificio. Las células inmunes fueron recuperadas y cultivadas en una densidad de 2.10⁶ células en 1 mL de RPMI 1640 conteniendo 10% de SFB, L-glutamina, estreptomina y penicilina, durante 4 hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Durante este tiempo las células fueron estimuladas con PMA/ionomicina de calcio en presencia de brefeldina (GolgiPlug, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Luego de la incubación, se realizó la marcación celular de membrana con los anticuerpos anti-CD3e-FITC, anti-CD45-V500, anti-CD4-PE-Cy^{TM7} y anti-CD8-PercP-Cy5.5 y la marcación intracelular con los anticuerpos anti-IL-4-APC, anti-IL-17A-PE y anti-IFN-γ-BV421 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), siguiendo las instrucciones del kit comercial BD Cytotfix/Cytoperm Plus (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Luego de la marcación, las células fueron analizadas por citometría de flujo. La viabilidad celular fue analizada utilizando la tinción con Zombie-NirTM (BioLegend, San Diego, CA, USA).

5. Evaluar la capacidad de las diferentes formulaciones como vehículo de vacunas a subunidades administradas de forma tópica.

5.1. Evaluar la capacidad de las formulaciones para transportar un colorante a través de Epidermis Murinas Reconstituidas (EMR).

5.1.1. Obtención de epidermis murinas reconstituidas (EMR): Las EMRs fueron obtenidas a partir de cultivos primarios de queratinocitos murinos de acuerdo a un protocolo desarrollado por el Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC) de la Université de Poitiers. Brevemente, queratinocitos epidérmicos murinos normales (NMEK por su sigla en inglés) fueron aislados de un conjunto de pieles obtenidas de ratones neonatos de la cepa C57BL/6J y se sembraron en una densidad de 2×10^5 células/cm² utilizando el medio CnT07 (CELLnTEC, Berna, CHE) complementado con penicilina/estreptomina 1X y gentamicina 200 ng/ml. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ hasta alcanzado el 80% de confluencia. Los NMEK fueron despegados de la botella de cultivo utilizando la enzima Trypsin LE-express (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en una concentración de $1,125 \times 10^6$ células/mL en medio CnT07 y se sembraron insertos de cultivo de policarbonato (0,63 cm² de área con un tamaño de poro de 0,4 µm de diámetro, Millipore, Burlington, MA, USA) con 400 µL de la suspensión celular. Los insertos se depositaron en el fondo de placas de seis pocillos que contenían 3 mL de medio CnT07 con 1,5 mM de calcio. Después de 24 h de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂, los queratinocitos se expusieron a la interfaz aire/líquido agregando una compresa estéril debajo de cada inserto y reemplazando el medio CnT07 por 3 ml de medio de diferenciación compuesto por medio EpiLife complementado con HKGS (Cascade Biologics, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y suplementado con 1,5 mM de calcio, 50 µg/ml de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 3 ng/ml de KGF recombinante murino (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Este medio se renovó cada 2 días hasta el uso de los EMR [170].

5.1.2. Evaluación de la capacidad de transportar proteínas a través de EMR: Se incorporó el colorante fluorescente Lucifer Yellow CH (LY) en una concentración 1 mM a las diferentes formulaciones liposomales obtenidas. Un volumen de 200 µl de cada una de las formulaciones fue depositado en la superficie de los EMRs obtenidos previamente y se incubaron por 4hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Luego de la incubación, el medio de cultivo depositado debajo de los distintos

EMRs fue recolectado y se midió su fluorescencia a 540 nm (excitación 428nm) utilizando el equipo Thermo Scientific Varioskan™ Flash (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se calcularon los porcentajes de permeabilidad en función de un control de permeabilidad total. Como indicador del 100% de permeabilidad se realizó una dilución de LY en el medio de cultivo correspondiente al total disponible de este colorante en las formulaciones incubadas. Se realizaron tres ensayos independientes y los resultados fueron expresados en función de la permeabilidad basal presentada por los EMRs para su normalización. La permeabilidad basal fue probada mediante la incubación del LY en PBS.

5.2. Evaluar la capacidad de las formulaciones de estimular queratinocitos y fibroblastos murinos *in vitro*.

5.2.1. Estimulación de queratinocitos: NMEK aislados como se describió en el punto

5.1.1 se resuspendieron en una concentración de 1×10^5 células/ml en medio CnT07 y se sembraron placas de 24 pocillos con 1 ml de la suspensión celular. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ hasta alcanzado el 70-80% de confluencia. Luego de alcanzada la confluencia el medio fue reemplazado por medio basal CnT-PR-BM.1 (CELLnTEC, Berna, CHE) y las células fueron cultivadas *ON*. Posteriormente, se estimularon las células mediante el agregado de 10 µl de cada formulación evaluada, en los distintos pocillos, por 24hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Finalizada esta última incubación, las células fueron lisadas para la extracción del ARN. Se realizaron dos ensayos independientes con cada condición por duplicado.

5.2.2. Estimulación de fibroblastos: La obtención del cultivo primario de fibroblastos dérmicos murinos normales (NMDF por su sigla en inglés) fue adaptada a partir de un protocolo desarrollado por el LITEC, para la obtención de fibroblastos humanos [171]. Brevemente, los NMDF fueron aislados de un conjunto de pieles obtenidas de ratones neonatos de la cepa C57BL/6J y se sembraron en una densidad de 2×10^4 células/cm² utilizando el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) complementado con 10% de SFB, penicilina/estreptomicina 1X y gentamicina 200ng/ml. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ hasta alcanzado el 80% de confluencia. Los NMDF fueron despegados de la botella de cultivo utilizando tripsina-EDTA 0,5% al 1X (sin rojo de fenol; Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en una concentración de 2×10^4 células/ml en el mismo medio descrito previamente y se sembraron placas de 6 pocillos con 3 ml de la suspensión celular. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de

CO₂ hasta alcanzado el 70-80% de confluencia. Luego de alcanzada la confluencia el medio fue reemplazado por DMEM complementado con 0,5% de SFB y las células fueron cultivadas ON. Posteriormente, las células en los distintos pocillos se estimularon mediante el agregado de 30 µl de cada formulación evaluada por 24hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Finalizada esta última incubación, las células fueron lisadas y el material, recuperado para la extracción del ARN. Se realizaron dos ensayos independientes con cada condición por duplicado.

5.2.3. Extracción de ARN y RT-PCR: El ARN total de las distintas muestras se extrajo utilizando el kit NucleoSpin RNA siguiendo las recomendaciones del fabricante (Macherey-Nagel, Düren, DEU). El ARN obtenido fue cuantificado utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y 500 ng de material de cada muestra fue retrotranscrito utilizando la enzima SuperScript™ II (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Mediante RT-PCR y a partir del ADN copia (ADNc) obtenido se determinaron los niveles de expresión de los genes codificantes para distintas quemoquinas y citoquinas, utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 3) y la mezcla AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme, Nanjing, CHN). Para la amplificación y determinación de los productos se utilizó el equipo LightCycler 480 (Roche, Basilea, CHE). Las muestras se normalizaron a la expresión del gen control (*housekeeping*, HK), GAPDH y se informaron en relación a las muestras basales (sin estimular) según el método $\Delta\Delta CT$: $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT_{muestra} - \Delta CT_{basal})}$, donde $\Delta CT = CT_{gen\ de\ interés} - CT_{HK}$ para cada condición evaluada.

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para la evaluación de la expresión de citoquinas y quemoquinas.

Quemoquina/ Citoquina	Forward	Reverse
CXCL1	5'-CCTGAAGCTCCCTTGGTTC-3'	5'-AAATAGGACCCTCAAAAGAAATTG-3'
CXCL2	5'-CAGACTCCAGCCACACTTCA-3'	5'-GGTCTTCAGGCATTGACAGC-3'
CXCL3	5'-TGGTCAAGAAGTTGCCTCA-3'	5'-GGATGGATCGCTTTTCTCTG -3'
CXCL9	5'-CGAGGCACGATCCACTACAA-3'	5'-GAGTCCGGATCTAGGCAGGT-3'
CXCL10	5'-TGCCGTCATTTTCTGCCTCA-3'	5'-AGGCTCGCAGGGATGATTC-3'
CCL2	5'-AGCACCAGCCAACCTCACT-3'	5'-TCATTGGGATCATCTTGCTG-3'
CCL3	5'-AAGCAGCAGCGAGTACCAGT-3'	5'-GATGAATTGGCGTGAATCT-3'
CCL20	5'-CGTCTGCTCTCCTTGCTTT-3'	5'-CTTCATCGGCCATCTGTCTT-3'
IL-1 α	5'-TGAAACGTCAAAGATGTCAA-3'	5'-AGGTGTAAGGTGCTGATCTGG-3'
IL-6	5'-TGAACAACGATGATGCACTTG-3'	5'-CTCTGAAGGACTCTGGCTTTG-3'
TNF- α	5'-TTCTGTCTACTGAACCTCGGGGTGATCGGTCC-3'	5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'
IFN- β	5'-AGTACAACAGCTACGCCTGG-3'	5'-GAGTCCGCCTCTGATGCTTA -3'
GAPDH	5'-TGCGACTTCAACAGCAACTC-3'	5'-CTTGCTCAGTGCCTTGCTG-3'

Tratamiento estadístico: La distribución normal fue confirmada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el test de ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni para detectar diferencias entre grupos ($p < 0,05$). Los resultados se informan como media \pm Error Estándar de la Media (EEM) para cada grupo. En caso de distribuciones no normales, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Mann-Whitney para la comparación entre grupos. En este caso los resultados fueron reportados como mediana \pm rango intercuartil (RI) para cada grupo. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

Consideraciones éticas: Todos los procedimientos en animales se realizaron siguiendo las recomendaciones de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [172] y cuentan con la aprobación tanto del Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación (FBCB-UNL) registrada en el acta 10/15, como del Comité d'Éthique COMETHEA N°84, Poitou Charentes, por resolución número 017031616529463. A su vez, los ensayos realizados en la Universidad de Poitiers cumplieron con las recomendaciones FELASA, conforme lo que establece la normativa europea para la experimentación animal.

RESULTADOS

3. Obtener diversas formulaciones liposomales complementadas con: ODN-CpG, O-palmitoil manano y/o SAA de tipo Gemini.

3.1. Caracterización de las partículas obtenidas.

3.1.1. Tamaño y potencial ζ de las partículas obtenidos por DLS.

Se realizaron distintas formulaciones a partir del agregado de distintos inmunoestimulantes a liposomas pre-armados, con las siguientes concentraciones finales de cada componente: Liposomas (Lip) 4mM; ClfA 100 μ g/ml; ODN-CpG 7,5 nmol/ml; AG2-C16 400 μ M; O-Palmitoil manano (Man) 2mg/ml. Las distintas formulaciones obtenidas se enumeran en la Tabla 4 junto a los parámetros analizados por DLS: diámetro medio; índice de polidispersidad (IPD), valor que representa la distribución de tamaños de partículas en la muestra (valores menores a 0,5 corresponden a formulaciones con partículas de tamaños más homogéneos) y potencial zeta (PZ) como medida aproximada de la carga superficial de las vesículas.

Tabla 4: Resultados obtenidos por la técnica de DLS para cada una de las formulaciones obtenidas.

Formulaciones	D (nm)	IPD	PZ (mV)
Lip	184,8	0,196	nd
Lip+rClfA	207,8	0,252	21,6
Lip+ODN-CpG	1154,0	0,578	nd
Lip+ODN-CpG+rClfA	1205,3	0,576	nd
Lip+AG2-C16	207,8	0,224	56,6
Lip+AG2-C16+rClfA	212,0	0,232	36,2
Lip+AG2-C16+ODN-CpG	237,5	0,258	43,5
Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA	295,8	0,512	nd
Lip+OPM	303,8	0,329	3,03
Lip+OPM+rClfA	305,8	0,251	1,84
Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA	445,2	0,264	-0,34

D: diámetro medio (nm).

IPD: índice de polidispersidad.

PZ: potencial zeta (mV) (nd: dato no determinado).

Como se puede observar en la Tabla 4 el agregado de los distintos inmunoestimulantes afecta tanto el diámetro como el PZ de las partículas. Tanto para las formulaciones Lip+ODN-CpG como Lip+ODN-CpG+rClfA se puede ver cómo el agregado del ODN-CpG aumenta el IPD a valores mayores a 0,5, lo que indica una pérdida en la homogeneidad de tamaños e impediría la determinación del PZ. A su vez, se puede ver cómo la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG presenta tamaños y un IPD menor a la formulación Lip+ODN-CpG. Sin embargo, ante el agregado de rClfA (Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA) el IPD y, en menor medida el diámetro

medio, vuelven a aumentar. Respecto al PZ, si se comparan las formulaciones Lip+rClfA y Lip+AG2-C16+rClfA se puede observar que el PZ de las partículas aumenta con el agregado de AG2-C16. La incorporación de OPM, por otro lado, en las formulaciones Lip+OPM y Lip+OPM+rClfA resultó en un incremento en el diámetro de los liposomas y en una clara disminución de la carga superficial de las partículas respecto a Lip+rClfA. Un dato interesante es que el agregado de ODN-CpG a esta formulación (Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA) resulta en un leve incremento del diámetro de partículas respecto a Lip+OPM+rClfA, manteniendo un bajo IPD.

3.1.2. Tamaño y forma de los liposomas obtenidos por microscopía.

Se aplicaron las técnicas de MET y MEB sobre las formulaciones obtenidas con el fin de conocer no sólo la morfología de las vesículas lipídicas, sino también de obtener medidas alternativas del diámetro de las partículas.

En la tabla 5 se observa la comparación entre los diámetros medios determinados para cada formulación por la técnica de DLS y los calculados a partir de las mediciones obtenidas de 10 a 25 vesículas capturadas en distintas imágenes adquiridas por MET (Fig. 21) y MEB (Fig. 22). Mientras que fue posible realizar determinaciones en todas las formulaciones por la técnica de MET, sólo cuatro pudieron ser evaluadas mediante MEB debido al surgimiento de problemas técnicos en el microscopio durante el ensayo.

Tabla 5: Comparación de los diámetros medios de las vesículas lipídicas obtenidos alternativamente por las técnicas de DLS, MET y MEB.

Formulaciones	Diámetro medio (nm)		
	DLS	MET	MEB
Lip	184,8	163,5±37,7	nd
Lip+rClfA	207,8	127,8±44,8	nd
Lip+ODN-CpG	1154,0	134,8±28,1	167,1±24,7
Lip+ODN-CpG+rClfA	1205,3	194,1±37,3	116,0±16,3
Lip+AG2-C16	207,8	177,0±46,6	233,8±81,9
Lip+AG2-C16+rClfA	212,0	167,6±34,3	nd
Lip+AG2-C16+ODN-CpG	237,5	172,2±37,1	194,7±60,7
Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA	295,8	170,3±46,0	nd
Lip+OPM	303,8	173,9±51,8	nd
Lip+OPM+rClfA	305,8	170,8±40,0	nd
Lip+OPM+ODN-CpG	nd	141,5±29,0	nd
Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA	445,2	145,9±30,9	nd

nd: dato no determinado

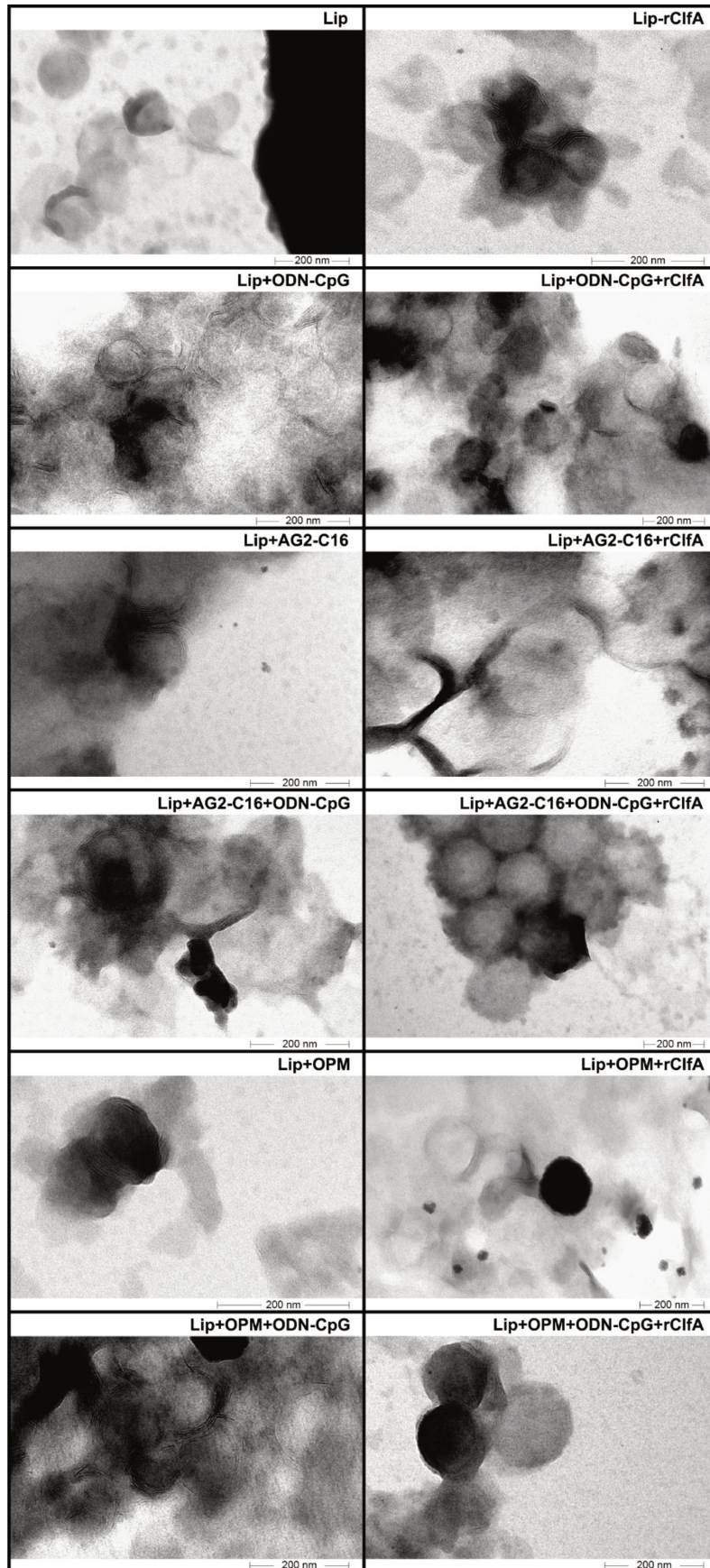


Fig. 21: Imágenes obtenidas por MET de las formulaciones liposomales evaluadas. En el ángulo superior derecho de cada imagen se observa el nombre de la formulación, mientras que en el inferior derecho se presenta la escala utilizada en cada captura.

Como se muestra en la Fig. 21, en todas las formulaciones evaluadas por MET fue posible observar las membranas lipídicas de las partículas lo que permitió determinar que a pesar del agregado de los distintos inmunostimulantes se conserva la forma esférica de las partículas. Mediante esta técnica el diámetro obtenido (Tabla 5) considera la membrana como límite externo de la vesícula, ya que la coloración utilizada permite observar la bicapa lipídica pero no aquellos agregados que se encuentran sobre la superficie de la partícula. Así, si bien los diámetros obtenidos para las formulaciones Lip y Lip+AG2-C16 se corresponden con los determinados por DLS, ante el agregado de rClfA u OPM que pueden adherirse a la superficie (Lip+rClfA, Lip+AG2-C16+rClfA, Lip+OPM, Lip+OPM+rClfA) los diámetros determinados por MET resultan menores a los obtenidos por DLS. Los diámetros medios calculados por MET se mantuvieron entre 100 y 200 nm para todas las formulaciones, incluso para aquellas que contenían ODN-CpG y presentaron IPD y diámetro medio elevados por DLS.

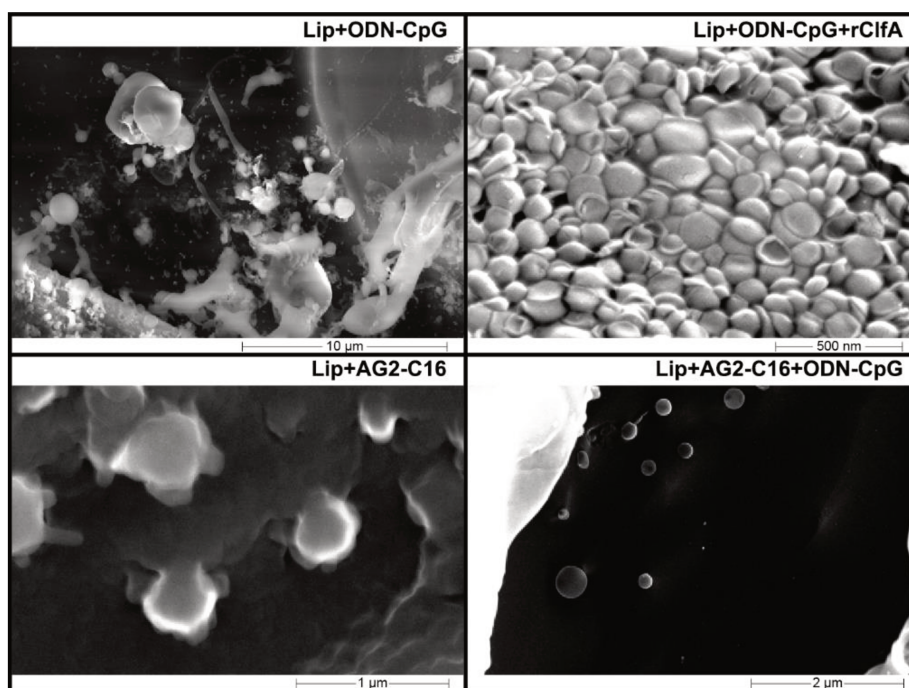


Fig. 22: Imágenes obtenidas por MEB de cuatro de las formulaciones liposomales evaluadas. En el ángulo superior derecho de cada imagen se observa el nombre de la formulación, mientras que en el inferior derecho se presenta la escala utilizada en cada captura.

En cuanto a las imágenes adquiridas por MEB (Fig. 22), en las cuatro formulaciones evaluadas fue posible observar la presencia de vesículas esféricas. En cuanto a los resultados obtenidos para cada formulación, se pudo comprobar que la utilización de ODN-CpG (formulaciones Lip+ODN-CpG y Lip+ODN-CpG+rClfA) genera el agregado de los liposomas, lo que se traduce en una mayor inestabilidad de estas formulaciones en el tiempo. Las grandes diferencias encontradas entre los diámetros obtenidos por MEB y DLS, para estas formulaciones, se deberían a este efecto (Tabla 5), siendo mayores los diámetros obtenidos mediante DLS, ya

que esta técnica no puede diferenciar partículas individuales de agregados. Respecto a la formulación Lip+AG2-C16, se observaron estructuras esféricas de morfología conservada, sin presencia de agregados. Por último, así como se observó por DLS, la adición de AG2-C16 a las formulaciones que contienen ODN-CpG, Lip+AG2-C16+ODN-CpG, brindaría una mayor estabilidad a la formulación, que se visualizaría como la ausencia de grandes agregados liposomales. En estos últimos dos casos los diámetros medios obtenidos por MEB resultaron semejantes a los determinados por DLS y MET.

3.2. Efecto de las formulaciones liposomales en la acción de ADNAsas sobre el ODN-CpG.

Debido a la elección de un ODN-CpG con enlaces fosfodiéster, sensibles a la acción de ADNAsas, se decidió evaluar la capacidad de liposomas de proteger a este inmunoestimulante de su degradación cuando son suministrados en conjunto. Para esto, una formulación liposomal con ODN-CpG fue sometida a la acción de la RQ1 ADNasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Debido a que dentro del protocolo se indicaba la realización de un shock térmico (ST) a 65 °C por 10 minutos y a que se desconocían los efectos de este tratamiento sobre la estabilidad de la formulación, se realizó el ensayo, alternativamente, con y sin la inactivación de la enzima por ST.

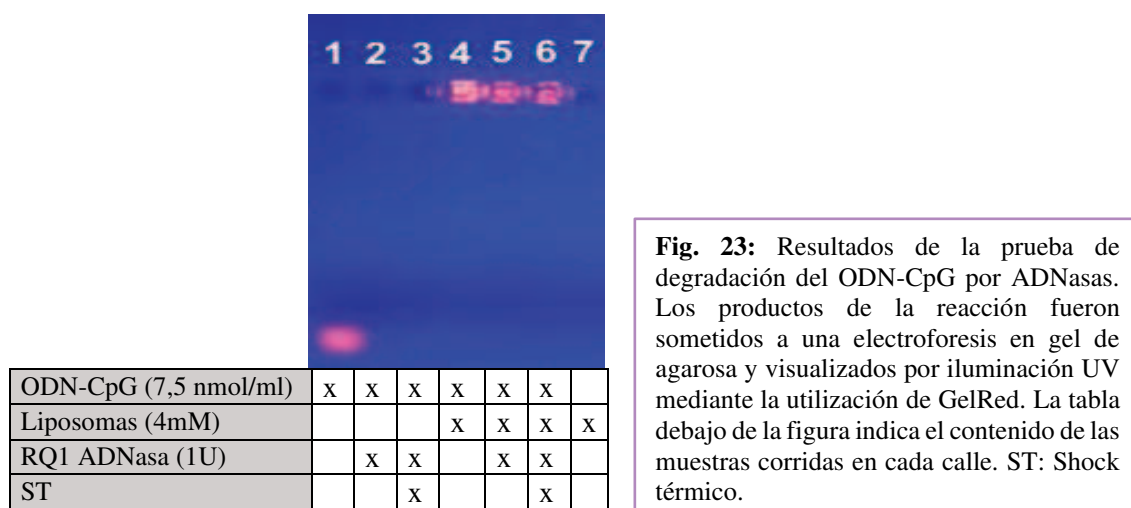


Fig. 23: Resultados de la prueba de degradación del ODN-CpG por ADNAsas. Los productos de la reacción fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa y visualizados por iluminación UV mediante la utilización de GelRed. La tabla debajo de la figura indica el contenido de las muestras corridas en cada calle. ST: Shock térmico.

En la Fig. 23 se presentan los resultados obtenidos para este análisis. En las calles 1-3 se sembró el ODN-CpG libre sometido a distintos tratamientos. En la calle 1 se encuentra el oligonucleótido sin tratamiento alguno, demostrando su integridad y capacidad migratoria en el gel de agarosa. A su vez, en las calles 2-3 se visualiza el producto resultante del tratamiento con ADNasa sin y con sometimiento a ST, respectivamente. La desaparición de la banda, en ambos casos, demuestra la capacidad de la enzima de degradar la secuencia en estudio en su totalidad, independientemente de la aplicación del ST. Por otro lado, en la calle 7 se observa la corrida de una muestra de liposomas, lo que demuestra la ausencia de una fluorescencia propia de los lípidos. Por último, en las calles 4-6 se sembró la formulación liposomal con ODN-CpG. En la calle 4 se visualiza la formulación sin ningún tipo de tratamiento, lo que demuestra la capacidad de los

liposomas de incorporar al ODN-CpG e impedirle migrar a lo largo del gel. Al visualizarse los productos del tratamiento de esta muestra con la ADNasa sin y con ST (calles 5 y 6, respectivamente), fue posible determinar que la enzima no fue capaz de degradar al ODN-CpG formulado en liposomas y que, a su vez, el ST no afecta la estabilidad y la migración de las formulaciones liposomales.

4. Evaluar, en un modelo murino, la utilización de las formulaciones obtenidas como adyuvante en vacunas a subunidades contra un antígeno de *S. aureus*.

4.1. Respuesta inmune obtenida en ratones de la cepa BALB/c que recibieron 2 dosis.

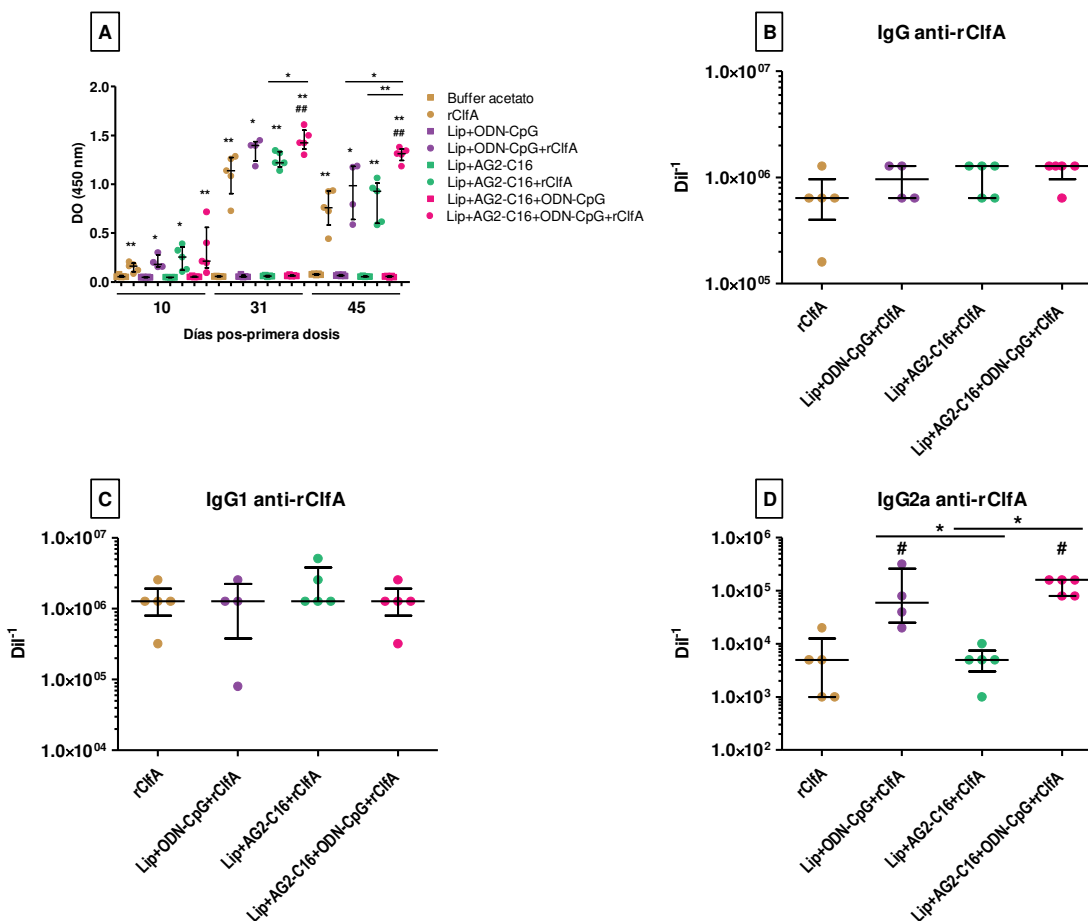
4.1.1. Niveles de IgG anti-rClfA en sueros obtenidos a lo largo del protocolo.

Se realizó un primer protocolo de inoculación en ratones hembra de la cepa BALB/c dónde se evaluó la cinética de la respuesta humoral a lo largo de un protocolo de dos dosis distanciadas tres semanas y hasta pasadas 3 semanas de la última dosis. En esta etapa, se estudiaron los efectos de la inmunización con el antígeno libre (rClfA), así como de su incorporación en tres formulaciones liposomales con distintos inmunoestimulantes; Lip+ODN-CpG+rClfA; Lip+AG2-C16+rClfA y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA. Los grupos control recibieron las mismas formulaciones sin el antígeno. Todos los grupos se conformaron con 5 animales en cada uno, excepto el grupo Lip+ODN-CpG+rClfA (n=4) debido a la pérdida de un animal durante el ensayo, por motivos ajenos al mismo.

Respecto a la producción de IgG específica (Fig. 24-A) se encontró que si bien, luego de la primera dosis, los 4 grupos experimentales mostraron un incremento en los niveles de IgG anti-rClfA respecto a sus grupos control (diferencias significativas presentadas en gráfica 24-A: día 10), la aplicación de una segunda dosis fue necesaria para alcanzar altos niveles de anticuerpos. Pasados 10 días de la segunda dosis todos los grupos experimentales presentaron mayores niveles de anticuerpos que sus respectivos grupos control con distintos grados de significancia (ver gráfica 24-A: día 31). A este tiempo, el grupo Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA superó los niveles de anticuerpos alcanzados por los grupos rClfA ($p<0,01$) y Lip+AG2-C16+rClfA ($p<0,05$). Dos semanas más tardes (Fig. 24-A: día 45), se puede observar que los niveles de anticuerpos en todos los grupos experimentales tienden a disminuir, excepto en el grupo Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA. Este último grupo mantuvo altos niveles de anticuerpos hasta el último tiempo evaluado, conservándose la diferencia con el grupo rClfA ($p<0,01$) e incrementándose las diferencias con los otros dos grupos que recibieron adyuvante, Lip+ODN-CpG+rClfA ($p<0,05$) y Lip+AG2-C16+rClfA ($p<0,01$).

En la Fig. 24-B se presentan los títulos de IgG específica al día 31. Como se puede observar, si bien no se detectaron diferencias significativas entre los grupos, el grupo Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA presentó en 4 de 5 animales títulos de anticuerpos mayores a 1×10^6 , mientras que en el grupo rClfA sólo 1 de 5 animales superó este valor, registrándose también en

este grupo la mayor dispersión de valores. Lo antes mencionado podría justificar las diferencias estadísticas encontradas entre estos dos grupos al evaluar los niveles de anticuerpos en una dilución fija.



Por otro lado, y considerando que AG2-C16 presenta una parte proteica, se decidió chequear la posible presencia de anticuerpos específicos contra este lipopéptido. No se detectaron anticuerpos anti-AG2-C16 (datos no mostrados).

4.1.2. Niveles de IgG1 e IgG2a anti-rClfA en sueros obtenidos luego de la segunda dosis.

Al determinarse los títulos de IgG1 específica (Fig. 24-C), no se encontraron diferencias entre los niveles alcanzados por las distintas formulaciones, siendo en la mayoría de los animales mayores a 1×10^6 . Sin embargo, al evaluarse los niveles de IgG2a (Fig. 24-D), las dos formulaciones conteniendo ODN-CpG como inmunoestimulante (Lip+ODN-CpG+rClfA y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA) indujeron títulos semejantes entre sí y superiores a los alcanzados por las formulaciones rClfA y Lip+AG2-C16+rClfA ($p < 0,05$, en todos los casos).

4.1.3. Niveles de IgG e IgA anti-rClfA en lavados vaginales a lo largo del protocolo.

Para evaluar la respuesta humoral en mucosas inducidas por las formulaciones evaluadas, se tomaron muestras de lavados vaginales a distintos tiempos y se evaluaron en ellas los niveles de IgG e IgA específicas para rClfA.

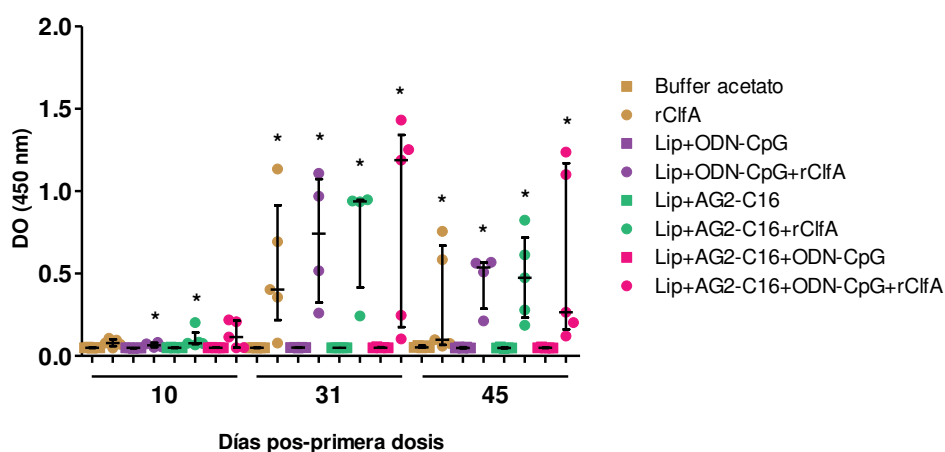


Fig. 25: Niveles de IgG específica en lavados vaginales de ratones de la cepa BALB/c inmunizados con rClfA incorporado en diferentes formulaciones, durante el esquema de inmunización de dos dosis suministradas a los días 0 y 21. Las determinaciones se realizaron por ELISA indirecto en las muestras obtenidas a lo largo del protocolo. Los lavados vaginales se probaron en una dilución fija de 1/4. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney a cada tiempo. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco animales en cada grupo y el RI. * $p < 0,05$ vs. sus respectivos grupos control.

Como se observa en la Fig. 25, luego de la primera dosis (día 10), en algunos animales se detectaron pequeños incrementos en los niveles de IgG, mientras que la segunda dosis fue capaz de inducir un aumento significativo en todos los grupos experimentales respecto a sus grupos control (día 31) ($p < 0,05$). Luego de dos semanas (día 45) si bien se observó una tendencia a la disminución de estos anticuerpos en secreción vaginal, los niveles permanecieron elevados manteniéndose las diferencias significativas.

Respecto a la determinación de los niveles de IgA, no se detectaron anticuerpos específicos de este isotipo en ninguna de las muestras analizadas (datos no mostrados).

4.2. Respuesta inmune obtenida en ratones de la cepa BALB/c que recibieron 2 dosis y un refuerzo pre-sacrificio.

4.2.1. Niveles de IgG anti-rClfA en sueros obtenidos al sacrificio.

Se realizó un segundo ensayo en la cepa BALB/c donde se decidió evaluar el efecto del protocolo de dos dosis y un refuerzo 72 hs antes del sacrificio, sobre la respuesta inmune humoral y celular. En esta etapa, se evaluó el antígeno libre (rClfA), así como su incorporación en tres formulaciones liposomales con distintos inmunoestimulantes; Lip+ODN-CpG+rClfA; Lip+AG2-C16+rClfA y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA. Los grupos control recibieron las mismas formulaciones sin el antígeno.

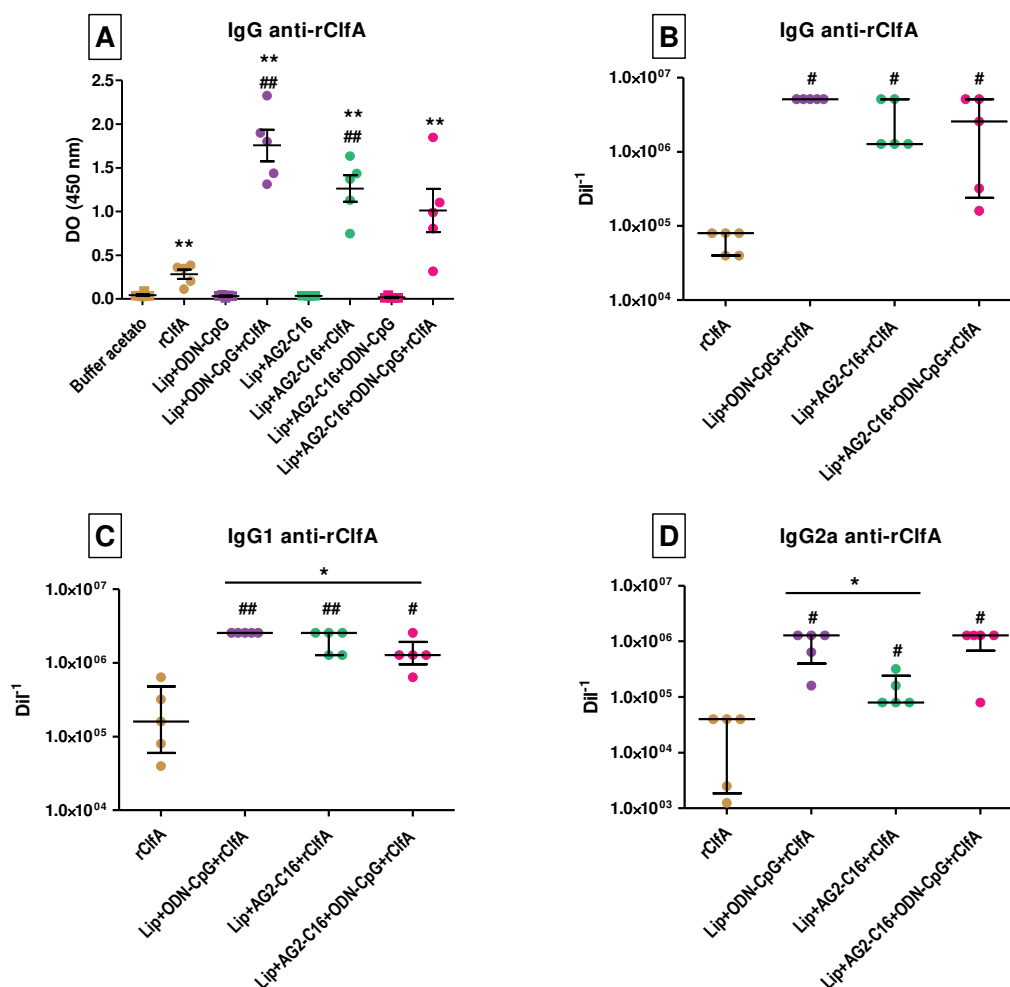


Fig. 26: Niveles de IgG específica en sueros de ratones de la cepa BALB/c inmunizados con dos dosis y un refuerzo pre-sacrificio de rClfA incorporado en diferentes formulaciones. Las determinaciones se realizaron por ELISA indirecto en las muestras obtenidas al sacrificio. **A-** Niveles de IgG anti-rClfA en los grupos evaluados. Los sueros se probaron en una dilución fija de 1/20000. En los grupos con niveles aumentados de anticuerpos específicos se determinó: **B-** Título de IgG anti-rClfA; **C-** Título de IgG1 anti-rClfA; **D-** Título de IgG2a anti-rClfA. Como controles se utilizaron sueros de ratones inmunizados con formulaciones sin el antígeno. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco animales en cada grupo y el RI. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, vs. sus respectivos grupos control. Las comparaciones entre adyuvantes se indican con líneas negras. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, respecto al grupo rClfA.

De la respuesta humoral (Fig. 26) se puede decir que ningún animal presentó anticuerpos contra los antígenos recombinantes previos al plan de inmunización (datos no mostrados). El análisis de los sueros obtenidos al sacrificio de los animales mostró que los grupos control fueron incapaces de inducir la producción de anticuerpos específicos (Fig. 26-A), mientras que los cuatro grupos experimentales presentaron niveles de IgG más altos que sus respectivos grupos control ($p < 0,01$, en todos los casos). Al medir los títulos de IgG en las formulaciones experimentales (Fig. 26-B), se encontró que la utilización de cualquiera de los adyuvantes evaluados indujo títulos semejantes entre sí y, en todos los casos, mayores a los obtenidos por la formulación rClfA ($p < 0,05$).

4.2.2. Niveles de IgG1 e IgG2a anti-rClfA en sueros obtenidos al sacrificio.

Respecto a los títulos de IgG1 (Fig. 26-C) e IgG2a (Fig. 26-D) alcanzados por las distintas formulaciones, se puede decir que todas las formulaciones liposomales indujeron títulos superiores a los alcanzados por el antígeno libre con distintos grados de significancia. Al comparar los adyuvantes se encontró que los títulos de IgG1 en el grupo Lip+ODN-CpG+rClfA resultaron superiores a los del grupo Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA. Sin embargo, ambas formulaciones indujeron títulos de IgG2a semejantes, siendo, a su vez, los niveles estimulados por la formulación Lip+ODN-CpG+rClfA, superiores a los obtenidos con la formulación Lip+AG2-C16+rClfA.

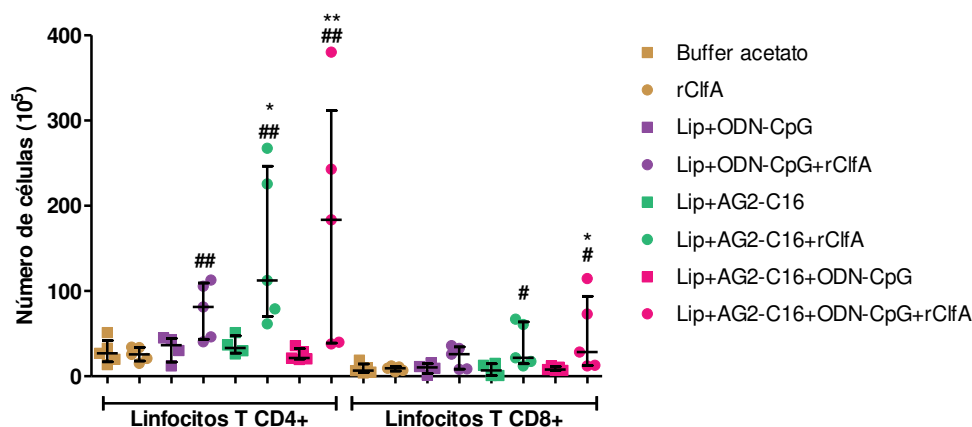


Fig. 27: Número de linfocitos T CD4+ y CD8+ encontrados en los ganglios linfáticos de ratones de la cepa BALB/c inmunizados con dos dosis y un refuerzo 72 hs pre-sacrificio de rClfA incorporado en diferentes formulaciones. Las determinaciones se realizaron por citometría de flujo en un pool de células obtenido de cada animal a partir de los ganglios axilares y submandibulares. Previamente, las células fueron cultivadas durante 4 hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO2 en presencia de PMA/ionomicina de calcio y brefeldina. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco animales en cada grupo y el RI. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, vs. sus respectivos grupos control. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, respecto al grupo rClfA.

4.2.3. Niveles de linfocitos T CD4+ y CD8+ en ganglios linfáticos.

Al analizar las subpoblaciones de linfocitos T (Fig. 27) presentes en los ganglios axilares y cervicales de los animales tratados se pudo determinar que los animales que recibieron las formulaciones Lip+AG2-C16+rClfA y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA presentaron un número

de linfocitos T CD4+ significativamente mayor a sus grupos control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente). A su vez, las tres formulaciones liposomales indujeron un aumento en el número de este tipo celular respecto a la utilización del antígeno libre ($p < 0,01$).

Respecto al estudio de los linfocitos T CD8+, los grupos Lip+AG2-C16+rClfA y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA presentaron un aumento de estas respecto al grupo rClfA ($p < 0,05$), sin embargo, sólo el último mostró un aumento respecto a su grupo control ($p < 0,05$).

4.2.4. Niveles de linfocitos T CD4+ productores de IL-4, IL-17 e IFN- γ en ganglios linfáticos.

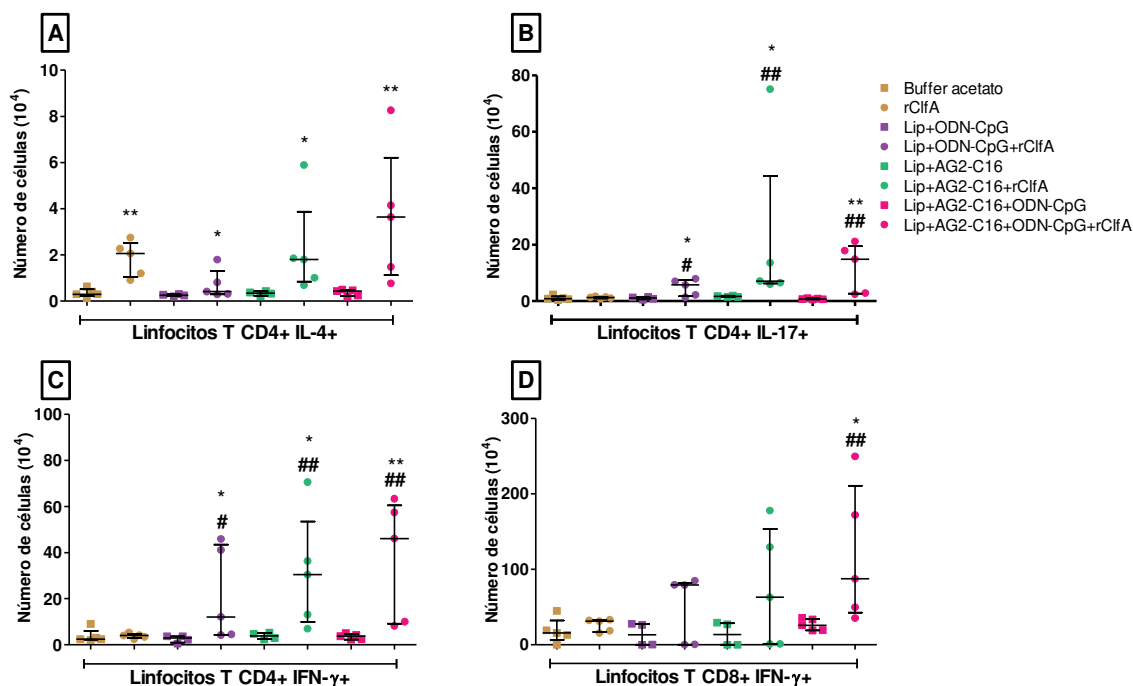


Fig. 28: Número de linfocitos T CD4+ y CD8+, productores de IL-4, IL-17 e IFN- γ , encontrados en los ganglios linfáticos de ratones de la cepa BALB/c inmunizados con dos dosis y un refuerzo 72 hs pre-sacrificio de rClfA incorporado en diferentes formulaciones. Las determinaciones se realizaron por citometría de flujo en un pool de células obtenido de cada animal a partir de los ganglios axilares y submandibulares. Previamente las células fueron cultivadas durante 4 hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ en presencia de PMA/ionomicina de calcio y brefeldina. **A, B y C-** Número de linfocitos T CD4+ capaces de producir IL-4, IL-17 e IFN- γ , respectivamente; **D-** Número de linfocitos T CD8+ capaces de producir IFN- γ . Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco animales en cada grupo y el RI. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, vs. sus respectivos grupos control. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, respecto al grupo rClfA.

Al estudiar las citoquinas producidas por los linfocitos T CD4+, se encontró que el número de células productoras de IL-4 (Fig. 28-A) se vio aumentado en todas las formulaciones experimentales respecto a los grupos control con distintos grados de significancia. Por otro lado, si bien, al analizar los números de linfocitos T CD4+ productoras de IL-17 (Fig. 28-B) e IFN- γ (Fig. 28-C) no se encontraron diferencias entre los distintos adyuvantes, las formulaciones Lip+ODN-CpG+rClfA, Lip+AG2-C16+rClfA y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA, indujeron un

aumento respecto tanto a sus grupos control como al grupo rClfA, con distintos grados de significancia.

4.2.5. Niveles de linfocitos T CD8+ productoras de IFN- γ en ganglios linfáticos.

Al evaluar los niveles de los linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ (Fig. 28-D) se encontró que la utilización de cualquiera de los adyuvantes liposomales evaluados genera una tendencia a su aumento. Sin embargo, sólo la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA incrementa significativamente los niveles de linfocitos Tc efectores respecto tanto a su grupo control ($p < 0,05$) como al grupo rClfA ($p < 0,01$).

Cabe destacar que, en todos los casos evaluados, las respuestas celulares observadas dependerían de la presencia del antígeno en la formulación, ya que en los animales de los grupos control no se detectaron variaciones en los números de células en ninguna determinación.

4.3. Respuesta inmune obtenida en ratones de la cepa C57BL/6J que recibieron 2 dosis y un refuerzo pre-sacrificio.

4.3.1. Niveles de IgG anti-rClfA en sueros obtenidos al sacrificio.

Se realizó un tercer ensayo en la cepa C57BL/6J donde se decidió evaluar el efecto del protocolo de dos dosis y un refuerzo pre-sacrificio. Las formulaciones incluidas en este ensayo fueron las estudiadas previamente en ratones de la cepa BALB/c. A su vez, se incluyeron las formulaciones Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA.

De la respuesta humoral (Fig. 29) se puede decir que ningún animal presentó anticuerpos contra los antígenos recombinantes previos al plan de inmunización (datos no mostrados). Los grupos control fueron incapaces de inducir la producción de anticuerpos específicos (Fig. 29-A), a excepción del grupo Lip+AG2-C16+ODN-CpG que mostró un aumento en los niveles de IgG respecto al grupo Buffer acetato ($p < 0,01$). Respecto a los grupos experimentales previamente evaluados, todos presentaron un aumento en los niveles de IgG específicas, respecto a sus grupos control con distintos grados de significancia (ver gráfica 29-A). Las formulaciones Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA indujeron niveles de anticuerpos específicos semejantes a los estimulados por el resto de los adyuvantes evaluados.

Al medir los títulos de IgG en los animales inoculados con las formulaciones experimentales (Fig. 29-B), se encontró que la utilización de cualquiera de los adyuvantes evaluados indujo títulos semejantes entre sí, con una tendencia al aumento respecto a la formulación rClfA pero sin diferencias significativas.

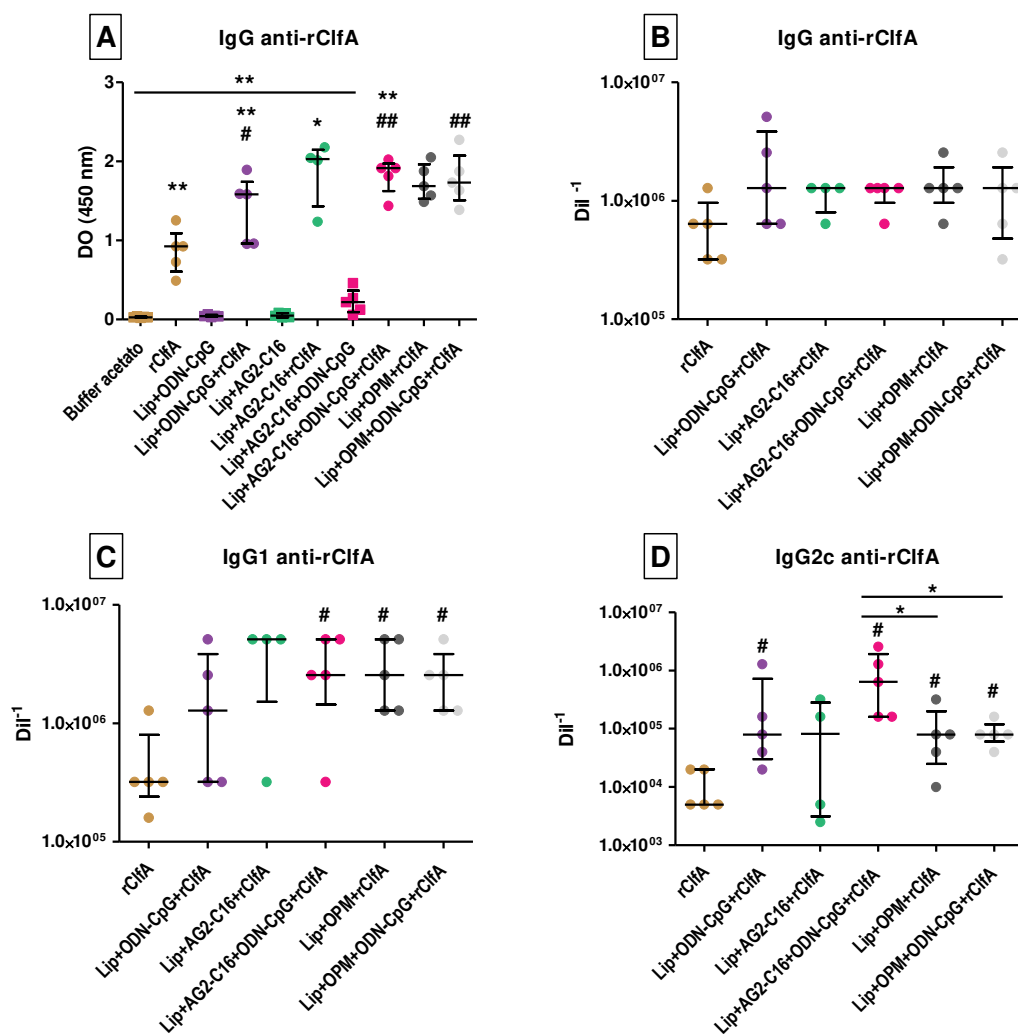


Fig. 29: Niveles de IgG específica en sueros de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con dos dosis y un refuerzo pre-sacrificio de rClfA incorporado en diferentes formulaciones. Las determinaciones se realizaron por ELISA indirecto en las muestras obtenidas al sacrificio. **A-** Niveles de IgG anti-rClfA en los grupos evaluados. Los sueros se probaron en una dilución fija de 1/10000. En los grupos con niveles aumentados de anticuerpos específicos se determinó: **B-** Título de IgG anti-rClfA; **C-** Título de IgG1 anti-rClfA; **D-** Título de IgG2c anti-rClfA. Como controles se utilizaron sueros de ratones inmunizados con formulaciones sin el antígeno. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco animales en cada grupo y el RI. *p<0,05; **p<0,01, vs. sus respectivos grupos control. Las comparaciones entre adyuvantes se indican con líneas negras. #p<0,05; ##p<0,01, respecto al grupo rClfA.

4.3.2. Niveles de IgG1 e IgG2c anti-rClfA en sueros obtenidos al sacrificio.

Respecto a los títulos de IgG1 (Fig. 29-C) alcanzados por las distintas formulaciones, si bien no se encontraron diferencias entre los títulos alcanzados por todos los adyuvantes evaluados, las formulaciones Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA, Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA indujeron títulos mayores a los alcanzados por el grupo rClfA (p<0,05, en todos los casos).

Al estudiar los títulos de IgG2c (Fig. 29-D) alcanzados por los distintos grupos, se encontró que todos los adyuvantes evaluados, excepto Lip+AG2-C16+rClfA, indujeron títulos

superiores a los del grupo rClfA ($p < 0,05$). Cabe destacar que si bien el grupo Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA presentó títulos semejantes a los alcanzados por el grupo Lip+ODN-CpG+rClfA, superó los títulos alcanzados por las formulaciones conteniendo OPM como inmunoestimulante, Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA ($p < 0,05$, en ambos casos).

4.3.3. *Niveles de linfocitos T CD4+ y CD8+ en ganglios linfáticos.*

Al analizar las subpoblaciones de linfocitos T (Fig. 30) presentes en los ganglios axilares y submandibulares, no se encontraron diferencias significativas en el número de linfocitos T CD4+ ni T CD8+ entre los grupos experimentales y sus respectivos controles a excepción del grupo Lip+ODN-CpG+rClfA que presentó un incremento respecto a Lip+ODN-CpG ($p < 0,01$, en ambos casos). A su vez, no se registraron diferencias entre las distintas formulaciones experimentales evaluadas. Sin embargo, cabe destacar la tendencia de las formulaciones Lip+ODN-CpG+rClfA y Lip+AG2-C16+rClfA a aumentar el número de ambos tipos celulares respecto a la utilización del antígeno libre. Asimismo, en los grupos Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA los niveles de estas células se encontraron aumentados solo en algunos animales, mientras que la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA no presentó ninguna diferencia respecto al antígeno libre.

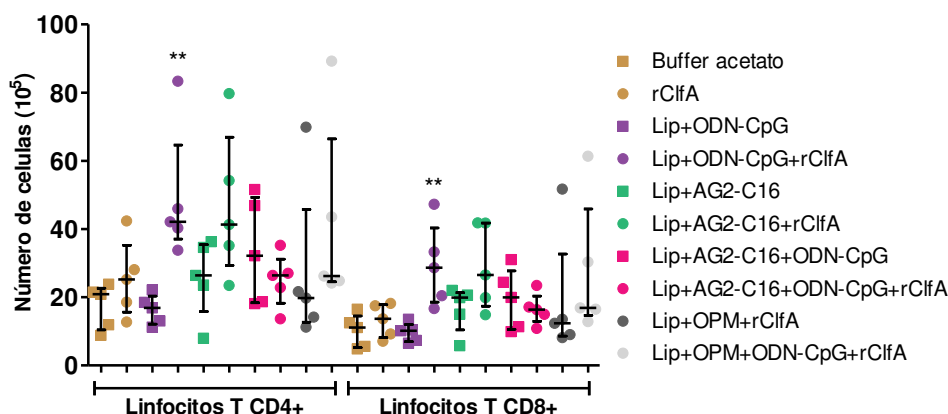


Fig. 30: Número de linfocitos T CD4+ y CD8+ encontrados en los ganglios linfáticos de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con dos dosis y un refuerzo 72 hs pre-sacrificio de rClfA incorporado en diferentes formulaciones. Las determinaciones se realizaron por citometría de flujo en un pool de células obtenido de cada animal a partir de los ganglios axilares y submandibulares. Previamente las células fueron cultivadas durante 4 hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO2 en presencia de PMA/ionomicina de calcio y brefeldina. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco animales en cada grupo y el RI. ** $p < 0,01$, vs. sus respectivos grupos control.

Al observar las formulaciones control, sin antígeno, se puede observar una clara tendencia al aumento de ambos tipos celulares en los grupos Lip+AG2-C16 y Lip+AG2-C16+ODN-CpG respecto a los grupos Buffer acetato y Lip+ODN-CpG.

4.3.4. Niveles de linfocitos T CD4+ productores de IL-4, IL-17 e IFN- γ en ganglios linfáticos.

Al estudiar las citoquinas producidas por los linfocitos T CD4+, se encontró que el número de células productoras de IL-4 (Fig. 31-A) se vio aumentado en los grupos rClfA y Lip+ODN-CpG+rClfA respecto a sus controles ($p < 0,01$, en ambos casos). Por otro lado, mientras la formulación Lip+AG2-C16+rClfA mostró una tendencia al aumento respecto a su control, la administración de la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA no generó cambios respecto al propio. No se encontraron diferencias entre las distintas formulaciones experimentales, sin embargo, se evidenció un aumento en el grupo control Lip+AG2-C16+ODN-CpG respecto al grupo Buffer acetato ($p < 0,01$).

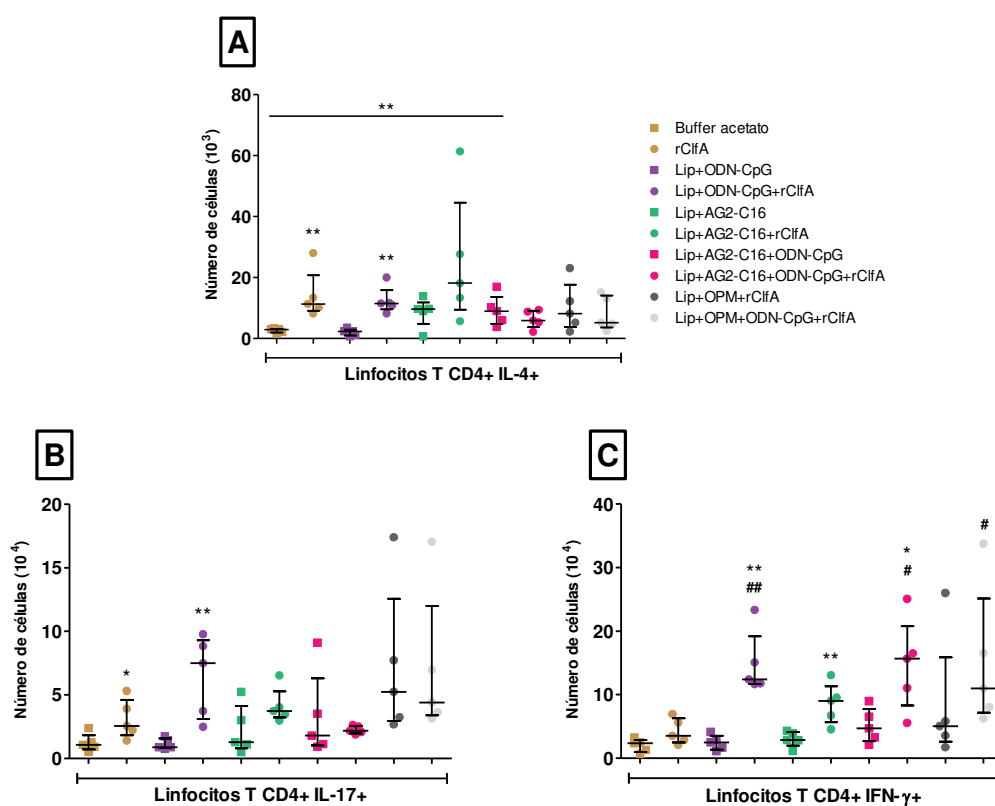


Fig. 31: Número de linfocitos T CD4+, productores de IL-4, IL-17 e IFN- γ , encontrados en los ganglios linfáticos de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con dos dosis y un refuerzo 72 hs pre-sacrificio de rClfA incorporado en diferentes formulaciones. Las determinaciones se realizaron por citometría de flujo en un pool de células obtenido de cada animal a partir de los ganglios axilares y submandibulares. Previamente las células fueron cultivadas durante 4 hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ en presencia de PMA/ionomicina de calcio y brefeldina. **A, B y C-** Número de linfocitos T CD4+ capaces de producir IL-4, IL-17 e IFN- γ , respectivamente. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco animales en cada grupo y el RI. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, vs. sus respectivos grupos control. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, respecto al grupo rClfA.

Al evaluar los niveles de linfocitos T CD4+ productores de IL-17 (Fig. 31-B), nuevamente, sólo las formulaciones rClfA y Lip+ODN-CpG+rClfA indujeron un incremento

respecto a sus controles ($p < 0,05$; $p < 0,01$, respectivamente). Asimismo, los grupos Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA presentaron una tendencia al aumento en los niveles de estas células sin diferencias significativas respecto a los demás grupos experimentales evaluados.

Por último, al analizar los números de linfocitos T CD4+ productores de IFN- γ (Fig. 31-C), se observó que en los grupos Lip+ODN-CpG+rClfA, Lip+AG2-C16+rClfA y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA se encontraban incrementados respecto a sus controles ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente). A su vez, las formulaciones experimentales que contenían ODN-CpG, Lip+ODN-CpG+rClfA, Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA, indujeron niveles de linfocitos T CD4+ IFN- γ + superiores a los alcanzados con el antígeno libre ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,05$, respectivamente).

4.3.5. Niveles de linfocitos T CD8+ productoras de IFN- γ e IL-17 en ganglios linfáticos.

Se estudiaron los niveles de linfocitos T CD8+ productoras de IFN- γ (Fig. 32-A) y se encontró que la formulación Lip+ODN-CpG+rClfA fue la única capaz de generar un incremento respecto a su grupo control ($p < 0,05$). Por otro lado, el grupo Lip+AG2-C16+rClfA si bien no presentó un aumento respecto a su control, presentó un número de células mayor al alcanzado por el grupo rClfA ($p < 0,05$). No se evidenciaron otras diferencias entre grupos experimentales ni controles.

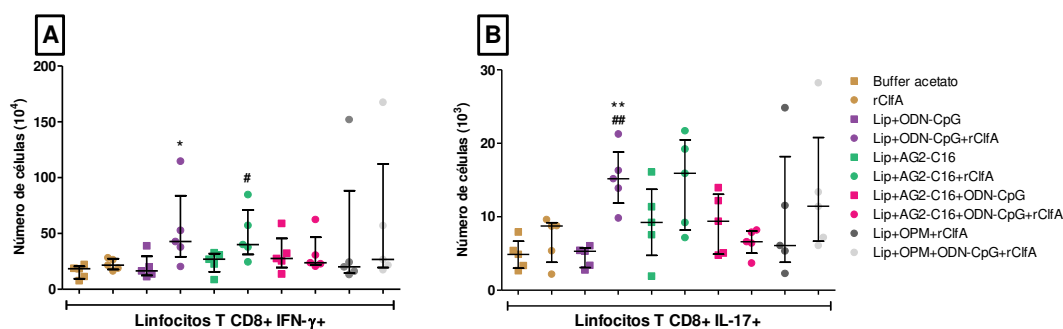


Fig. 32: Número de linfocitos T CD8+, productores de IFN- γ e IL-17, encontrados en los ganglios linfáticos de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con dos dosis y un refuerzo 72 hs pre-sacrificio de rClfA incorporado en diferentes formulaciones. Las determinaciones se realizaron por citometría de flujo en un pool de células obtenido de cada animal a partir de los ganglios axilares y submandibulares. Previamente las células fueron cultivadas durante 4 hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ en presencia de PMA/ionomicina de calcio y brefeldina. **A** y **B**- Número de linfocitos T CD8+ capaces de producir IFN- γ e IL-17, respectivamente. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco animales en cada grupo y el RI. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, vs. sus respectivos grupos control. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, respecto al grupo rClfA.

Para finalizar, se evaluó el número de linfocitos T CD8+ productores de IL-17, presentes en cada grupo. En la Fig. 32-B, se observa una tendencia al aumento de estas células en todos los grupos que recibieron adyuvante, a excepción de los grupos Lip+ODN-CpG y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA que mantienen niveles semejantes a los alcanzados por los animales inoculados con Buffer acetato. Sin embargo, sólo el grupo Lip+ODN-CpG+rClfA presenta un

incremento significativo del número de linfocitos T CD8+ IL-17+ respecto a su grupo control y al grupo rClfA ($p < 0,01$, en ambos casos).

5. Evaluar la capacidad de las diferentes formulaciones como vehículo de vacunas a subunidades administradas de forma tópica.

5.1. Capacidad de las formulaciones de transportar un colorante a través de EMRs.

Luego de observar que la administración intradérmica de las formulaciones permite obtener respuestas celulares y altos niveles de anticuerpos y considerando que una alternativa a las vías de administración tradicionales de vacunas es la vía transdérmica, se evaluó la capacidad de los distintos adyuvantes de mejorar el pasaje de un colorante a través de la epidermis. De esta manera, se buscó conocer si alguna de las formulaciones evaluadas previamente, sería capaz de actuar como vehículo de un antígeno en el posible diseño de una vacuna de aplicación tópica o transcutánea.

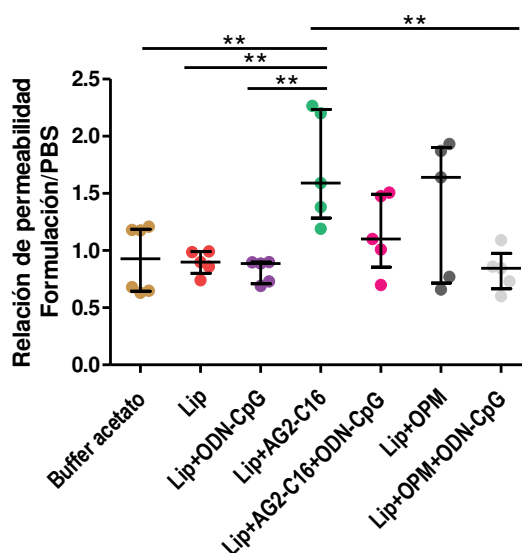


Fig. 33: Capacidad de las formulaciones para transportar un colorante a través de EMRs. EMRs obtenidas a partir de cultivos primarios de queratinocitos murinos, fueron puestas en contacto con las distintas formulaciones liposomales, conteniendo el colorante fluorescente LY. Un volumen de cada una de las formulaciones fue depositado en la superficie de los EMRs y se incubaron por 4hs. Posteriormente, el medio de cultivo depositado debajo de los distintos EMRs fue recolectado y se midió su fluorescencia a 540 n. Como indicador del 100% de permeabilidad se realizó una dilución de LY en el medio de cultivo correspondiente al total disponible de este colorante en las formulaciones incubadas. La permeabilidad basal fue probada mediante la incubación del LY en PBS. En la gráfica, el porcentaje de permeabilidad para cada formulación se expresa de manera relativa al porcentaje obtenido para la condición basal (PBS) en cada ensayo. Los resultados presentados corresponden a 3 ensayos independientes. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para cinco determinaciones por formulación y el RI. $**p < 0,01$, las líneas negras indican diferencias entre grupos.

En la Fig. 33 se presentan los resultados obtenidos para estos ensayos, expresados en relación a la permeabilidad obtenida para la condición basal (PBS), siendo los valores cercanos a

1 indicativos de que no hubo variación respecto a esta condición. La condición utilizada como basal se seleccionó con base en ensayos previos realizados por el LITEC, dónde se demostró que de formarse correctamente el EMR, la incubación con PBS resulta en una baja penetración para el LY [170]. Como se observa en la gráfica, la utilización de buffer acetato no modifica el pasaje basal del colorante a través de la epidermis. Resultados similares se obtienen al utilizar como vehículo las formulaciones Lip, Lip-ODN-CpG y Lip+OPM+ODN-CpG. Por su lado, la incorporación de AG2-C16 en la formulación Lip+AG2-C16 incrementó la permeabilidad de los epitelios de manera significativa respecto tanto al uso del colorante libre (Buffer acetato, $p < 0,01$), como formulado en liposomas (Lip, $p < 0,01$), alcanzando, en algunos casos, a duplicar el pasaje basal. Asimismo, la formulación Lip+OPM mostró una tendencia similar, aunque con mayor variabilidad entre ensayos. Sin embargo, estas mismas formulaciones al ser suplementadas con ODN-CpG (Lip+AG2-C16+ODN-CpG y Lip+OPM+ODN-CpG) presentan una reducción de su capacidad de penetración hasta valores basales.

5.2. Capacidad de las formulaciones de activar queratinocitos y fibroblastos in vitro.

5.2.1. Niveles de activación de genes codificantes para quemoquinas.

Continuando con el estudio de las distintas formulaciones como candidatos en el diseño de vacunas de aplicación tópica o transcutánea, se evaluaron sus capacidades para inducir la activación de genes codificantes para quemoquinas en queratinocitos y fibroblastos.

En la Fig. 34 se observan los resultados obtenidos al evaluar los niveles de expresión de las quemoquinas CXCL1/2/3/9/10 y CCL2/3/20 en NMDF. Los resultados fueron expresados por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y, para su visualización en conjunto, fueron representados en una matriz cromática de expresión (Fig. 35). Los valores cercanos a 1 representan que no hubo variación respecto a la condición control, representado en color negro, mientras que, el aumento en los niveles de expresión se representó en verde y la disminución en rojo.

Como se puede observar, los niveles de expresión de los genes evaluados no se vieron afectados por la utilización de buffer acetato. De los componentes individuales evaluados, se puede decir que el OPM fue capaz de incrementar los niveles de todos los genes evaluados respecto a la condición Buffer acetato ($p < 0,05$, en todos los casos). Por otro lado, si bien este inmunoestimulante al ser formulado en liposomas mantiene una tendencia al aumento de la expresión de todos estos genes, excepto CXCL3 y CCL3, ninguna de estas formulaciones alcanza los valores obtenidos al utilizar el OPM libre. Se debe destacar también que, al evaluar el efecto de la utilización de ODN-CpG libre, no se encontró una inducción en la expresión de CXCL9; sin embargo, las formulaciones liposomales que contienen este inmunoestimulante muestran una tendencia al aumento en la expresión de esta quemoquina en particular cuando este inmunoestimulante se formula de manera conjunta con AG2-C16, en las formulaciones Lip+AG2-C16+ODN-CpG y Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA.

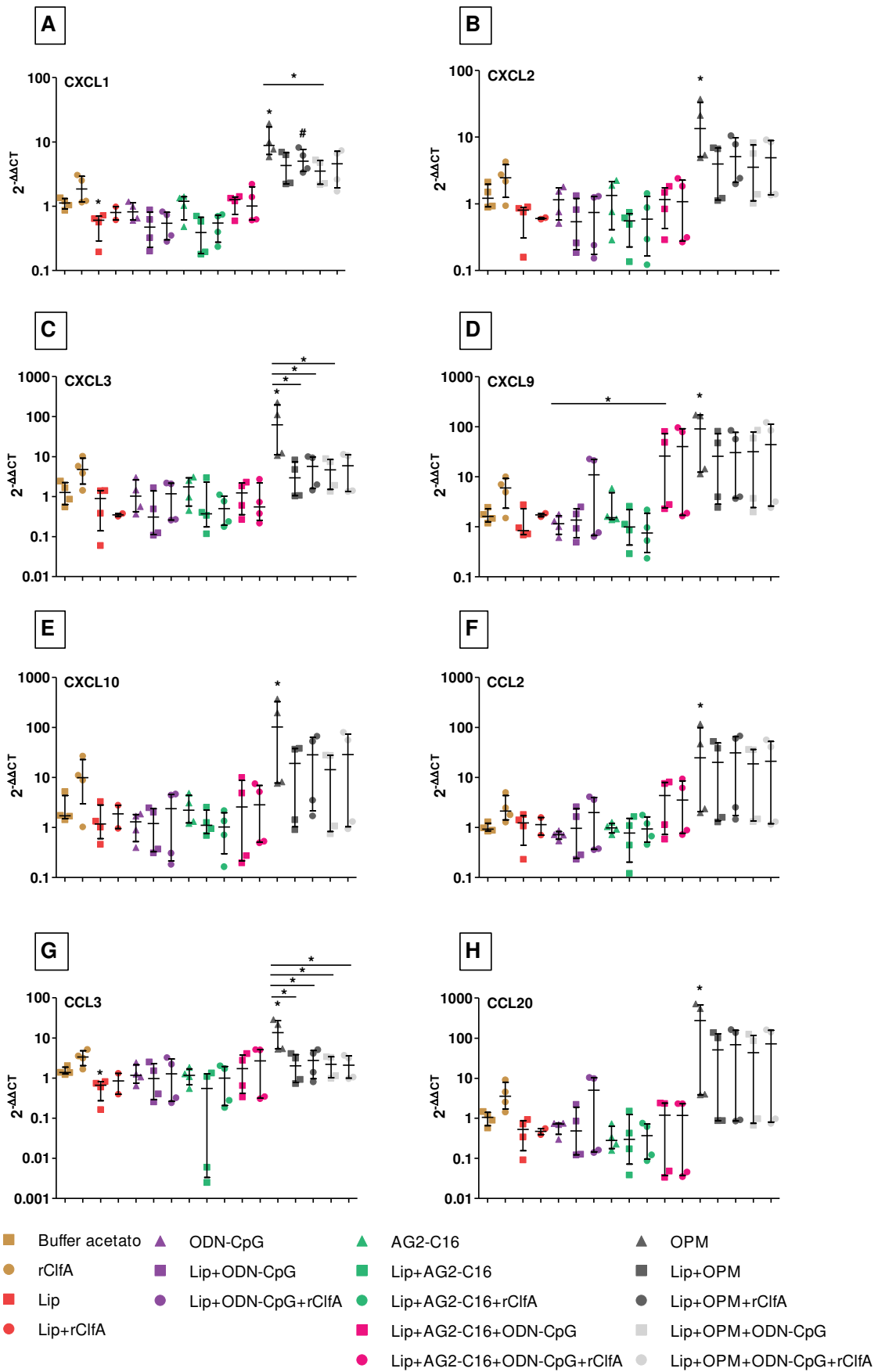


Fig. 34: Niveles de expresión de los genes codificantes de quemoquinas en NMDF. Se cultivaron NMDF obtenidos de ratones neonatos de la cepa C57BL/6J hasta obtener un cultivo en monocapa. Las monocapas de NMDF fueron estimuladas con las distintas formulaciones evaluadas durante 24 hs, para la posterior recuperación de ARN celular y la determinación de los niveles de las distintas quemoquinas mediante qPCR: **A-** CXCL1, **B-** CXCL2, **C-** CXCL3, **D-** CXCL9, **E-** CXCL10, **F-** CCL2, **G-** CCL3, **H-** CCL20. Los resultados se expresaron por el método de $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT_{\text{muestra}} - \Delta CT_{\text{control}})}$; donde $\Delta CT = C_{t_{\text{gen de interés}}} - C_{t_{\text{HK}}}$; siendo el *housekeeping* (HK) GAPDH y la muestra Control, NMDF sin estimular. Los resultados provienen de dos ensayos independientes donde cada formulación se evaluó por duplicado. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para las cuatro determinaciones en cada grupo y el RI. #p<0.05 vs. rClfA; *p<0.05 vs. Buffer acetato. Las líneas negras indican comparaciones entre formulaciones. Estos resultados se encuentran resumidos en la Fig. 35.

Finalmente, respecto a la evaluación de estas quemoquinas en NMEK se puede decir que, ninguna de las formulaciones evaluadas modificó la expresión de los genes analizados (datos no mostrados).

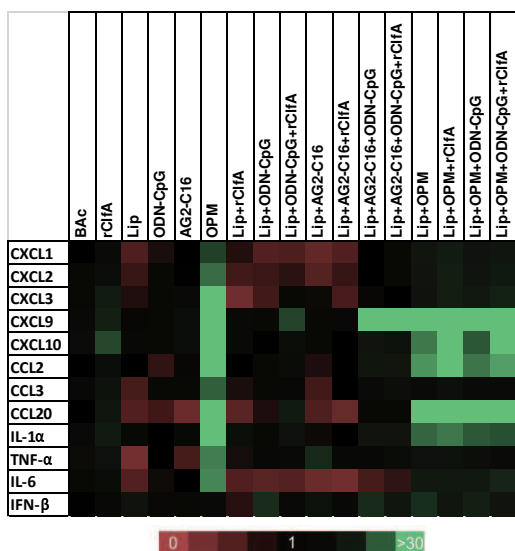


Fig. 35: Matriz de expresión. Se representa el valor medio de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C}$) para cada gen, en cada condición evaluada, con una escala de color. En verde se representa el aumento en la expresión del gen y en rojo la disminución, respecto a la condición control (no estimulada).

5.2.2. Niveles de activación de genes codificantes para citoquinas.

Por otro lado, se evaluó la capacidad de cada formulación de inducir la activación de genes codificantes para distintas citoquinas en queratinocitos y fibroblastos.

En la Fig. 36 se observan los resultados en NMDF, para cada muestra individual, obtenidos al evaluar los niveles de expresión de las citoquinas IL-1α, IL-6, TNF-α e IFN-β. Los resultados fueron expresados por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se representan en la matriz de expresión como se describió previamente (Fig. 35).

Al igual que con las quemoquinas, los niveles de expresión basal de las citoquinas evaluadas no se vieron afectados por el uso de buffer acetato. Respecto a la utilización de los distintos inmunoestimulantes libres, sólo OPM generó un incremento significativo en todas las citoquinas evaluadas, excepto IFN-β, respecto a la condición Buffer acetato (p<0,05, en todos los casos). Asimismo, las formulaciones liposomales que contenían OPM mostraron una tendencia al aumento de los niveles de expresión de IL-1α, IL-6, aunque sin alcanzar los valores obtenidos

al evaluarlo libre. No se encontraron variaciones en los niveles de IFN-β para ninguna de las formulaciones evaluadas.

Por último, al realizar el estudio en NMEK no se detectaron modificaciones en los niveles de expresión de las citoquinas evaluadas (datos no mostrados).

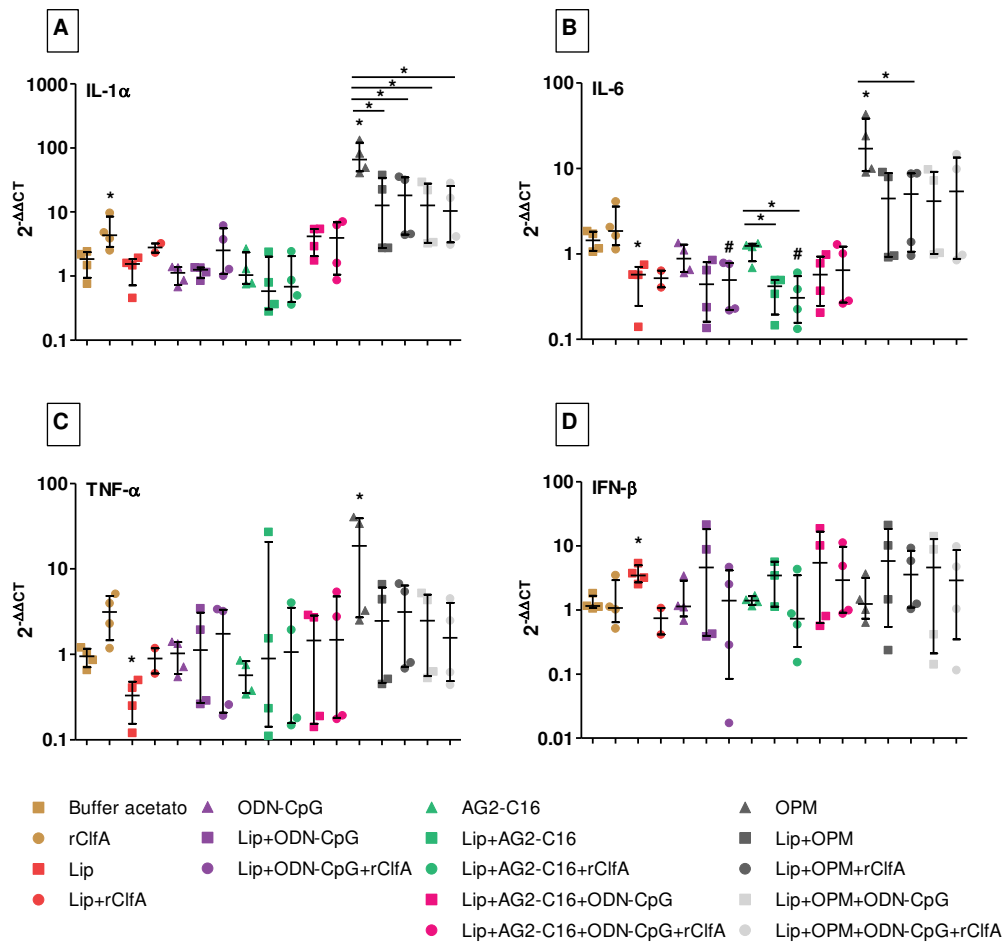


Fig. 36: Niveles de expresión de los genes codificantes de citoquinas en NMDF. Se cultivaron NMDF obtenidos de ratones neonatos de la cepa C57BL/6J hasta obtener un cultivo en monocapa. Las monocapas de NMDF fueron estimuladas con las distintas formulaciones evaluadas durante 24 hs, para la posterior recuperación del ARN celular y la determinación de los niveles de las distintas citoquinas mediante qPCR: **A-** IL-1α, **B-** IL-6, **C-** TNF-α, **D-** IFN-β. Los resultados se expresaron por el método de $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT_{muestra} - \Delta CT_{control})}$; donde $\Delta CT = Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{HK}$; siendo el *housekeeping* (HK) GAPDH y la muestra Control, NMDF sin estimular. Los resultados provienen de dos ensayos independientes donde cada formulación se evaluó por duplicado. Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney. Se muestra la mediana de los valores obtenidos para las cuatro determinaciones en cada grupo y el RI. #p<0.05 vs. rClfA; *p<0.05 vs. Buffer acetato. Las líneas negras indican comparaciones entre formulaciones. Estos resultados se encuentran resumidos en la Fig. 35.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se evaluó la incorporación de distintos inmunoestimulantes a un adyuvante liposomal destinado a la formulación de vacunas a subunidades. En una primera instancia se buscó obtener las distintas formulaciones propuestas y determinar si los inmunoestimulantes se incorporaban a los liposomas. Posteriormente, se estudió la capacidad de las distintas formulaciones obtenidas de inducir una respuesta inmune específica *in vivo* y el perfil generado, mediante la implementación de distintos planes de inmunización en modelos murinos. Por último, se buscó conocer la capacidad de las distintas formulaciones de actuar como vehículo y adyuvante para la inmunización transcutánea, en un modelo *in vitro*.

De la obtención y caracterización de las formulaciones liposomales.

Considerando que las características estructurales de los liposomas pueden determinar la respuesta inmune que inducen y que estas propiedades no dependen sólo de la composición de la formulación, sino que pueden estar influenciadas por el proceso de obtención, una mínima caracterización de las vesículas preparadas es siempre necesaria para probar que el producto obtenido se encuentra dentro de los parámetros esperados [58]. Las formulaciones obtenidas a lo largo de este trabajo fueron evaluadas por la técnica de DLS para la determinación del diámetro medio, IPD y el PZ de las partículas, medidas que se encuentran asociadas a la estabilidad de las partículas en suspensión. Como se puede observar en los resultados, el agregado de los distintos inmunoestimulantes sobre los liposomas pre-armados es capaz de afectar los 3 parámetros. Sin embargo, se debe resaltar que para todas las formulaciones los diámetros se encontraron comprendidos dentro del rango esperado para liposomas, típicamente establecido entre los 0,025 μm y 2,5 μm [52].

La suplementación con ODN-CpG generó un aumento en el IPD a valores mayores a 0,5, lo que indica no sólo la pérdida de la homogeneidad de tamaño, sino también una mayor inestabilidad de la formulación. Como han demostrado otros autores, este efecto se debería a la interacción entre las cargas positivas de los liposomas y las cargas negativas del ODN-CpG, pudiendo actuar este último como un “pegamento” entre liposomas adyacentes [173]. Este concepto pudo ser probado mediante las técnicas de MET y MEB, donde se pudo observar que las formulaciones que contenían ODN-CpG, presentaban efectivamente una mayor proporción de vesículas agregadas. Por otro lado, mediante la técnica de DLS se evidenció que ante el agregado de AG2-C16 a las formulaciones, se produce un aumento en el PZ. Este efecto podría explicarse por la presencia de dos residuos de ornitina en este lipopéptido que le brindan 2 cargas positivas a cada molécula [163], aumentando así el número de moles de lípidos catiónicos presentes en la formulación [57]. A su vez, se pudo observar que la formulación conjunta del oligonucleótido

con AG2-C16 presentó una disminución tanto en el diámetro medio como en el IPD de las partículas, respecto a la formulación Lip+ODN-CpG. Esto podría indicar que AG2-C16 favorece la disminución del tamaño de los agregados formados con el ODN-CpG, como fue demostrado por microscopía. Si bien no es de nuestro conocimiento que existan otros estudios de liposomas catiónicos suplementados con ambos inmunoestimulantes, se han reportado resultados semejantes al utilizarse un SAA de tipo *gemini* formulado en nanopartículas lipídicas neutras suplementado con un ODN-CpG. En este trabajo, los autores predicen una buena estabilidad coloidal de la suspensión basados en los resultados obtenidos por DLS, donde las partículas obtenidas resultaron de un diámetro medio cercano a los 200 nm con la presencia de una pequeña proporción de partículas de entre 0,5-1,0 μm que se deberían al agregado de vesículas durante su obtención [174].

Por otra parte, la incorporación de OPM a las formulaciones, el cual fue obtenido mediante la conjugación de ramificados de manosas con cloruro de palmitoílo [157], resultó en un incremento esperado en el diámetro de los liposomas [175], ya que estas estructuras de gran tamaño se depositarían en la superficie de los liposomas pre-armados. A su vez, se debe resaltar que el uso combinado de OPM y ODN-CpG genera un leve incremento en el diámetro de las partículas manteniendo un bajo IPD, semejante al obtenido por otros autores [176]. Este resultado se traduce en un aumento de la estabilidad de la formulación, que podría estar explicada por las cargas negativas de los OPM depositados en la superficie del liposoma, lo que conlleva a una gran disminución del PZ de las partículas, efecto observado también por otros autores [175]. Esto permite proponer para el OPM un mecanismo de estabilización de los liposomas con ODN-CpG, distinto al conferido por AG2-C16. Mientras que con AG2-C16, se lograría un aumento de los moles de cargas positivas disponibles, logrando una mayor compensación de las cargas negativas del ODN-CpG y, consiguiendo así, disminuir el agregado de las vesículas, en el caso del OPM, el aumento de estabilidad podría ser explicado por un enmascaramiento de las cargas positivas superficiales de los liposomas, impidiendo el efecto “pegamento” del ODN-CpG entre liposomas adyacentes.

La técnica de DLS brinda un diámetro hidrodinámico que puede estar influenciado por la capa de solvatación presente sobre cada partícula dependiente de distintos parámetros como la temperatura, viscosidad y concentración de la muestra [177]. Por este motivo, mediante las técnicas de microscopía se buscó no sólo conocer la morfología y distribución de las partículas, sino también obtener una medición alternativa del tamaño que podría acercarse más al diámetro real de las vesículas lipídicas. Respecto a estos resultados, se puede decir que en todas las formulaciones las partículas presentaron forma esférica y, en imágenes obtenidas por MET, se visualizó la aparición de líneas concéntricas en algunas vesículas, lo que indicaría que se trata de vesículas multilaminares. Basados en la forma, el tamaño y la laminaridad de las vesículas, se puede inferir que, mediante la técnica empleada para la obtención de las formulaciones,

efectivamente se generan liposomas con características semejantes tanto a vesículas de tipo SUV como OLV (Fig. 5, en “Introducción General”) [56]. Si bien la mayoría de los reportes relacionan el método de inyección etanólica con la obtención de SUV, se han encontrado evidencias que sugieren que tanto una velocidad de inyección lenta como una alta concentración de lípidos darían lugar a vesículas de mayor tamaño [178,179]. Ambas condiciones se cumplen en nuestro trabajo, pudiendo ser estos los motivos de la obtención de OLV. Sin embargo, es necesario un estudio más exhaustivo de las formulaciones para conocer la distribución porcentual de los distintos tipos de vesículas en las formulaciones.

Resulta interesante ver que los diámetros medios calculados por MET se mantienen entre 100 y 200 nm para todas las formulaciones. Esto permite inferir que, efectivamente, es posible añadir moléculas inmunoestimulantes o antígenos a liposomas pre-armados sin afectar su estructura original.

Se debe destacar el estudio de la interacción entre los liposomas catiónicos y el ODN-CpG, donde se pudo comprobar que a pesar del elevado IPD de algunas formulaciones, este no se debería a una deformación de las partículas o a una gran variación en su tamaño individual, sino a la presencia de agregados entre ellas, lo que coincide con lo reportado por otros autores [173]. A nuestro entender, estas observaciones están íntegramente relacionadas con la protección del ODN-CpG conferida por los liposomas contra la acción de la ADNasa. Así, como hemos demostrado en nuestros resultados, es posible entonces la utilización de oligonucleótidos con enlace fosfodiéster, sensibles a la acción de nucleasas, pudiendo ser protegidos de la degradación enzimática mediante su formulación en liposomas. Estos resultados se condicen con lo revisado por Hanagata, quien concluye que los ODN-CpG naturales no requieren de su inclusión dentro de nanopartículas para ser protegidos de la degradación enzimática, sino que basta con ser adsorbidos en la superficie de estas [151].

De la respuesta inmune generada en ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6J.

La capacidad de los distintos adyuvantes liposomales obtenidos, de inducir y dirigir el perfil de la respuesta inmune generada hacia el antígeno recombinante rClfA de *S. aureus* fue evaluada en dos modelos murinos, BALB/c y C57BL/6J. Basados en los conocimientos actuales sobre la estructura y funcionalidad de las células presentes en la piel, en todos los ensayos las formulaciones evaluadas fueron administradas por vía intradérmica.

Respecto a los ensayos realizados en ratones de la cepa BALB/c, en estos se evaluaron 2 inmunoestimulantes, AG2-C16 y ODN-CpG. En el estudio de la respuesta inmune humoral generada por las distintas formulaciones evaluadas se pudo determinar que, si bien una única dosis es capaz de inducir la producción de IgG específica, es necesaria una segunda dosis para alcanzar niveles elevados de anticuerpos capaces de mantenerse, al menos, hasta por 15 días, consistentemente con lo observado en otros protocolos de inmunización activa tanto en humanos

como en otras especies [180,181]. Considerando la inmunogenicidad previamente evaluada [110] del antígeno utilizado, la formulación de rClfA en distintos adyuvantes liposomales buscó principalmente diversificar el perfil de la respuesta inmune. Con esta finalidad, se estudiaron los subtipos de IgG estimulados por cada formulación. Si bien al estudiar la producción de IgG1 sus títulos mostraron una tendencia semejante a los resultados obtenidos para la IgG total, las diferencias entre el uso de los distintos adyuvantes se evidenciaron al estudiar los títulos de IgG2a. En este caso, independientemente del ensayo, las formulaciones que contenían ODN-CpG fueron capaces de generar títulos de IgG2a superiores a la utilización del antígeno libre, consistente con lo reportado en la bibliografía [149]. Estos resultados demostraron que con la utilización conjunta del ODN-CpG y un vehículo que le brinde protección, es posible utilizar un oligonucleótido natural y de bajo costo sin perder el efecto inmunoestimulante del mismo, como han demostrado también otros autores [68,120].

Considerando que *S. aureus* es tanto una bacteria comensal como patógena, y uno de los principales causantes de diversos tipos de infecciones cuando se produce una interrupción de la barrera epitelial de la piel o las mucosas, se estudió la capacidad de las distintas formulaciones de generar una respuesta inmune humoral local. Por este motivo, se estudiaron los niveles de IgG e IgA específica presentes en mucosa vaginal. Este tejido se escogió principalmente por la ventaja de poder obtenerse muestras a lo largo de todo el protocolo de inmunización sin presentar un grado de invasión elevado para el animal ni efectos adversos para su salud [182]. Se pudo constatar, que todas las formulaciones generaron un aumento en los niveles de IgG a lo largo del protocolo, consistente con la cinética de los niveles detectados en sangre para este isotipo, aunque con una mayor dispersión que podría estar asociada, no sólo a cuestiones técnicas, sino también al momento del ciclo reproductivo en el que se encontraba cada animal ya que los estros no fueron sincronizados antes de comenzar el plan [183]. Por otro lado, no se encontraron niveles detectables de IgA específica en ninguna de las muestras evaluadas. Esta prevalencia del isotipo IgG en el tracto genital de ratones hembra ha sido reportada previamente por otros autores, pudiendo estar asociada, al aumento sistémico de esta inmunoglobulina debido a la presencia del receptor neonatal de Fc (nFcR) en el tracto genital murino, el cual favorecería el pasaje de las IgG específicas a la mucosa vaginal [184,185]. Asimismo, hay autores que sugieren que para una efectiva inducción del isotipo IgA en el tracto genital se requiere que la inmunización sea local o intranasal [186]. Sin embargo, otros autores han publicado un ensayo previo donde ratones de la cepa BALB/c fueron inoculados por vía intradérmica con un antígeno recombinante de HIV, gp140, suplementado alternativamente con los inmunoestimulantes, Poli(I:C) (ácido poliinosinico-policitidílico) o CpG-1668. En este ensayo, se observó que en ambos casos se incrementaron los niveles de IgG específica, en mucosa vaginal, luego de la segunda dosis. Sin embargo, fue necesaria una tercera dosis para inducir niveles detectables de IgA en el tracto genital [187]. En otros ensayos realizados en nuestro laboratorio con el antígeno PmpD de

Chlamydia trachomatis, se estudió el efecto de una estrategia de *prime-boost*, consistente en una única dosis del plásmido pVAX1-GSF2-F2PmpD por vía intradérmica en la oreja (*ear-pinner*) seguida de dos dosis, del antígeno recombinante rF2PmpD en liposomas por vía nasal y el mismo antígeno libre o formulado en Lip+AG2-C16 o Lip+ODN-CpG por vía subcutánea. En este ensayo, solo luego de la tercera dosis fue posible detectar IgG e IgA en el tracto genital, obteniéndose los mayores valores al utilizar las formulaciones liposomales como adyuvante [188]. Basados en estos antecedentes, para poder determinar cuál de las formulaciones induciría una mejor respuesta inmune humoral en el tracto genital, sería necesario estudiar la influencia de una tercera dosis sobre nuestro modelo experimental.

Para el control eficiente de las infecciones causadas por *S. aureus*, se ha reportado que se requeriría de una respuesta inmune celular balanceada entre los perfiles Th1, Th2 y Th17 [189]. En ensayos previos, realizados en ratones, donde se probaron vacunas a subunidades contra *S. aureus* capaces de generar un perfil de respuesta Th17 se observó un aumento en la protección durante el desafío [190]. Asimismo, se reportó una disminución en la mortalidad de animales inmunizados con una vacuna a ADN que incluía las secuencias de las proteínas ClfA, FnBPA y la enzima sortasa de *S. aureus*. Esta protección se atribuyó a la inducción conjunta de los perfiles Th1 y Th2 [191]. Con base en estos antecedentes, se decidió estudiar la posible inducción de estos perfiles por las formulaciones evaluadas. Para esto, en ganglios obtenidos de los ratones inmunizados se analizaron los niveles de linfocitos T CD4+ productores de las siguientes citoquinas: IL-4 (Th2), IL-17 (Th17) e IFN- γ (Th1); así como los niveles de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ en los ratones inmunizados, característica de una respuesta T citotóxica activa [192]. Como se muestra en los resultados, si bien las respuestas celulares observadas en ratones BALB/c serían dependientes de la presencia de rClfA en la formulación, la inoculación con el antígeno libre no fue capaz de generar un incremento en los niveles de linfocitos T en ganglios. Sin embargo, el antígeno sería suficiente para inducir un aumento en el número de linfocitos T CD4+ activos, productores de IL-4, respecto a la administración de solución buffer, lo que se condice con la presencia de inmunoglobulinas específicas en el grupo rClfA. Estos resultados coinciden con lo reportado por Yang y col., quienes compararon la respuesta inmune generada por la proteína recombinante MEP1 de HIV-1, administrada de forma libre o formulada a Alhydrogel 2% (InvivoGen, vac-alu-250) en ratones. En este ensayo, observaron que si bien el antígeno era capaz de inducir una respuesta humoral específica y de promover el aumento de los niveles de IL-4, era incapaz de activar la respuesta celular, requiriendo la utilización del adyuvante [193]. En nuestro caso, este efecto podría deberse no sólo a la inmunogenicidad propia del antígeno evaluado, Clf, sino también a la porción TRX (tiorredoxina) presente en la recombinante como proteína de fusión, ya que ha sido reportada su alta inmunogenicidad [194]. A su vez, se observó que la utilización del antígeno al ser incluido en cualquiera de las formulaciones liposomales indujo el aumento del número de linfocitos T CD4+ productores de

IL-4, IL-17 e IFN- γ . De estos resultados, resulta interesante resaltar aquellos asociados a la utilización de AG2-C16 como inmunoestimulante, ya que, si bien la utilización de SAA de tipo *gemin*i como agentes de transfección o para el *delivery* de drogas está ampliamente reportada, existe, en nuestro conocimiento, un único reporte de su utilización en la formulación de adyuvantes [174]. Por esto, se debe señalar que la incorporación de AG2-C16 en la formulación estaría asociada con una mejoría en los niveles de producción de IL-17. Existe un reporte previo de un lipopéptido de *Borrelia burgdorferi* capaz de inducir la producción de IL-17 por linfocitos Th. Sin embargo, a diferencia de AG2-C16, este es un triacil lipopéptido denominado OspA, que por sus características estructurales interactúa con el heterodímero TLR1/2 [195–197]. Por otra parte, la activación del heterodímero TLR2/6 fue originalmente asociada a la inducción de un perfil Treg, aunque estudios posteriores han reportado que en pulmones y en el tejido linfoide asociado con el intestino (GALT) colaborarían con el desarrollo de una respuesta Th17 [198,199]. Considerando las semejanzas estructurales de AG2-C16 con un diacil-lipopéptido, podría considerarse la interacción con TLR2/6 como la posible vía de activación que utiliza esta molécula para desencadenar el perfil Th17; sin embargo, se requieren mayores estudios para conocer con exactitud su mecanismo de acción. Por otro lado, se debe resaltar que la utilización conjunta de AG2-C16 con el ODN-CpG, no sólo estabilizaría la formulación liposomal, sino que, además, potenciaría los efectos estimulantes del segundo. Siendo así, el grupo Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA el que alcanzó los mejores niveles tanto de linfocitos T CD4+ productores de IL-4, IL-17 e IFN- γ , como de linfocitos T CD8+ activos productores de IFN- γ . Este efecto fue reportado previamente por otros autores, que demostraron que ante el uso conjunto de un SAA de tipo *gemin*i con cadenas alifáticas de 16-C y un ODN-CpG incorporados en nanopartículas lipídicas e inoculados por vía intradérmica en ratones BALB/c, se obtenía un incremento en el número de células secretoras de IL-4 e IFN- γ [174]. Si bien no está claro el mecanismo por el que ejerce esta acción, se ha reportado que la presencia de SAA de tipo *gemin*i en la formulación de liposomas catiónicos incrementa la interacción de las vesículas lipídicas con la membrana celular, y por consiguiente la eficacia del *delivery* intracelular de drogas [200]. Un efecto semejante podría explicar la colaboración observada con el ODN-CpG, permitiéndole una mayor llegada al endosoma, lugar donde ejerce su efecto inmunoestimulante por contacto con el TLR9 [145], sin embargo, se requieren mayores estudios para confirmar esta teoría.

Por otro lado, se realizó el estudio de la respuesta inmune en ratones de la cepa C57BL/6J. Debido a la cronología de los ensayos, en este se pudo incluir un tercer inmunoestimulante, el OPM, que fue obtenido posteriormente a la realización de los ensayos en la cepa BALB/c. Al estudiar la respuesta inmune humoral, se encontró que todas las formulaciones que contenían el antígeno fueron capaces de inducir elevados títulos de IgG específica, semejantes entre sí. Además, si bien los títulos de IgG1 presentaron una tendencia semejante a los obtenidos para IgG, los títulos de IgG2c se vieron aumentados en los grupos que recibieron formulaciones conteniendo

el ODN-CpG. Estos resultados fueron consistentes con los encontrados en la cepa BALB/c en este mismo trabajo y coinciden con los efectos de este inmunoestimulante sobre la respuesta humoral, en ratones de la cepa C57BL/6, publicados anteriormente por otros autores [201]. Asimismo, se detectaron aumentos en los títulos de IgG2c al utilizarse OPM como inmunoestimulante. Previamente, se ha reportado la capacidad de adyuvantes liposomales complementados con polímeros de manosa para inducir un aumento tanto en el subtipo IgG1 como IgG2 en ratones, ante la inoculación de un antígeno proteico. En la mayoría de estos estudios se han utilizado como inmunoestimulante oligomanosas conformadas por 2 a 5 residuos de manosa, en lugar de un ramificado de mayor tamaño como el OPM [202]. Sin embargo, otros autores han podido demostrar este mismo efecto al formular un antígeno proteico con OPM en liposomas administrados de forma tópica [203]. Respecto al plan de inmunización realizado en la cepa C57BL/6J, se debe resaltar un resultado llamativo, que es la presencia de anticuerpos en el grupo control Lip+AG2-C16+ODN-CpG, evidenciados por niveles de DO que alcanzaron valores de hasta 0,450, para una dilución de suero 1/10000. Los linfocitos B de memoria expresan el TLR9 y se ha comprobado, a partir de linfocitos obtenidos de ratones C57BL/6 inmunizados, la capacidad del ODN-CpG 1826 libre de inducir la diferenciación a células plasmáticas y la producción de IgG específica en ausencia del antígeno *in vitro* [204]. Considerando este antecedente, y la capacidad de AG2-C16 de mejorar la capacidad inmunoestimulante del ODN-CpG como se demostró en BALB/c, el resultado obtenido podría indicar que Lip+AG2-C16+ODN-CpG por sí solo podría estar actuando como inmunomodulador, estimulando, por ejemplo, la producción de anticuerpos por los linfocitos B de memoria capaces de reconocer alguna fracción de la proteína recombinante. Si bien se requieren más ensayos para determinarlo, estos anticuerpos podrían estar reconociendo la fracción TRX aportada por el plásmido pET32a donde ClfA se encuentra clonado, ya que esta secuencia proviene de la proteína TrxA de *E. coli*, microorganismo comensal presente en intestino de ratones de laboratorio [205,206].

Respecto al estudio de la respuesta inmune celular en los ratones C57Bl/6J, todos los grupos que recibieron el antígeno formulado con adyuvante presentaron una tendencia al incremento en el número de linfocitos T CD4+ y CD8+, excepto el grupo Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA que será tratado de manera individual posteriormente en este texto. Sin embargo, sólo la formulación Lip+ODN-CpG+rClfA fue capaz de inducir el aumento tanto en los niveles de linfocitos T CD4+ productores de IL-4, IL-17 e IFN- γ , como de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ e IL-17. Respecto al uso de OPM como inmunoestimulante, nuestros resultados concuerdan con otros autores que han reportado que nanopartículas cubiertas con OPM son capaces de incrementar las respuestas T CD4+ y CD8+ específicas de antígeno [207]. Sin embargo, se requerirán más ensayos para tener una visión más clara del perfil de respuesta capaz de inducir, ya que no fue posible incorporar los grupos control para las formulaciones con OPM ni evaluarlas en ratones BALB/c. No obstante, se debe resaltar la tendencia de este

inmunoestimulante a aumentar los niveles de IL-17 tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ respecto a la utilización del antígeno libre. Resulta especialmente interesante la capacidad de las distintas formulaciones de inducir la producción de IL-17 por linfocitos T CD8+, conocidos como Tc17, ya que se ha reportado que este tipo celular juega un rol importante en la iniciación de una respuesta inmune temprana en animales previamente sensibilizados con el antígeno. Así, ante un desafío por vía tópica con el antígeno, las Tc17 inducirían el aumento de CXCL1, quimioattractante de neutrófilos, dentro de las primeras 3-6 horas post-exposición, estando implicadas así en el reclutamiento de las células innatas en el posible sitio de infección [208]. Este efecto sería clave, ya que se ha reportado que una respuesta inmune efectiva contra las infecciones cutáneas causadas por *S. aureus*, debe implicar el reclutamiento de neutrófilos y la formación de abscesos, necesarios para la eliminación bacteriana [209]. Asimismo, si bien no se han reportado asociaciones entre la generación de linfocitos Tc17 específicas de antígeno y la protección contra *S. aureus*, otros autores han demostrado, en ratones, tanto la capacidad de los linfocitos Tc17 en el control efectivo de infecciones virales, como su plasticidad para convertirse en células productoras de IFN- γ , Tc1 [210,211]. En cuanto a la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA, a diferencia de lo encontrado en BALB/c, presentó un incremento tanto respecto a su control como al uso del antígeno libre, sólo en el número de linfocitos T CD4+ productores de IFN- γ , mientras en el resto de los parámetros mantuvo niveles semejantes a los del control e incluso, en algunos casos, con una tendencia a la disminución. En un estudio sobre estrategias para el tratamiento de alergias, se reportó que la administración de altas concentraciones de ODN-CpG sería capaz de estimular una respuesta tolerogénica. Tanto en ratones como en humanos, esta actividad inmunosupresora se ha atribuido a la capacidad del ODN-CpG de estimular una respuesta reguladora mediada por la indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1). En este estudio se demostró que un ODN-CpG era capaz de activar una vía TLR9/TRIF y estimular la producción de IDO1 por un mecanismo inmunosupresor mediado por el aumento de IFN de tipo I [212]. Este mismo efecto fue reportado ante el uso de nanopartículas formuladas con el polímero catiónico polietilenoimina (PEI) y un ADN bacteriano con secuencias CpG no metiladas, denominadas DNP. En este último trabajo, los autores demostraron que los niveles séricos de IFN- γ e IFN tipo I se elevaron rápidamente en ratones tratados con DNP, siendo estimulados por vías dependientes e independientes de TLR9/Myd88, respectivamente. Asimismo, demostraron que la inducción de IDO en tejido linfoide fue dependiente del incremento del IFN tipo I e independiente de IFN- γ [213]. En ratones de la cepa BALB/c, la concentración de ODN-CpG utilizada en nuestros ensayos no generó un efecto inmunosupresor, además, su uso conjunto con AG2-C16 demostró potenciar su efecto inmunoestimulante, según los niveles de anticuerpos específicos observados. Si bien se requieren estudios complementarios para saber su mecanismo de acción, este efecto, podría deberse a un incremento en el *delivery* del oligonucleótido a la célula como se explicó anteriormente. Esto podría ser interpretado por el

sistema inmune como un aumento en el ODN-CpG disponible en la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA respecto al resto de las formulaciones, pudiendo inducir un perfil Treg capaz de inhibir los perfiles celulares estudiados. Estas diferencias encontradas a nivel de la respuesta celular entre los estudios realizados en BALB/c y C57BL/6J, podrían estar fundamentadas por el *background* genético de cada cepa, ya que se ha descrito, por ejemplo, que mientras en ratones de la cepa BALB/c prevalece la respuesta inmune de tipo Th2, los animales de la cepa C57BL/6 tienen una mayor predisposición hacia el perfil Th1 [214]. Teniendo en cuenta todos los puntos anteriormente mencionados, se incorporará el estudio de los niveles de IDO1 y la activación de Treg en futuros ensayos.

Cabe destacar que, ante la presencia de una parte proteica en el SAA AG2-C16, se decidió verificar la presencia de anticuerpos específicos contra este, tanto por ELISA como por Dot-Blot. Se puede decir que, al menos, por las técnicas y en las condiciones evaluadas no fue posible detectar anticuerpos anti-AG2-C16, lo que resulta alentador considerando que un adyuvante ideal no debe comprometer la tolerabilidad y seguridad de la vacuna, induciendo, por ej., una reacción de hipersensibilidad hacia el mismo [215]. Sin embargo, se requieren de mayores estudios para comprobar la seguridad de las formulaciones probadas [216].

Por último, se debe señalar que, si bien los datos no fueron mostrados, en el laboratorio se realizaron otros ensayos en modelos murinos con un antígeno proteico formulado con los distintos inmunoestimulantes en ausencia de liposomas. Estos experimentos resultaron en la inducción de una respuesta inmune con bajos niveles de anticuerpos específicos respecto a su incorporación en liposomas, por lo que se continuó con su estudio incorporándolos siempre a formulaciones liposomales [67,217]. Este resultado estaría soportado por la teoría que supone que, para mejorar el efecto de un inmunoestimulante, éste y el antígeno deben ser presentados a una misma APC, demostrando que el antígeno se encuentra dentro de un contexto con señales de alerta como sería la presencia conjunta de PAMPs [64]. Al utilizar formulaciones liposomales hemos podido demostrar tanto desde la caracterización de las formulaciones como desde el estudio de la respuesta inmune que tanto nuestro antígeno modelo como los inmunoestimulantes utilizados viajarían en la misma partícula pudiendo ser presentados en conjunto al sistema inmune.

De la capacidad de las formulaciones como adyuvante por vía transcutánea.

Una vacuna ideal debe ser segura, de fácil aplicación y capaz de generar una respuesta inmune protectora de larga duración [218]. Estos hechos, sumados al escaso cumplimiento de algunos pacientes con los planes de vacunación, colocan el desarrollo de procedimientos de inmunización no invasivos, sin aguja y sin dolor, como una prioridad para las agencias de salud pública [166]. Es por esto que la idea de una aplicación tópica o intradérmica de vacunas, mediante por ejemplo el uso de parches con microagujas, que no requiera de personal

especializado para su administración, resulta de gran interés a nivel mundial [219]. Considerando esto, se decidió evaluar la posibilidad de evaluar nuestras formulaciones liposomales como adyuvantes por vía transcutánea.

En una primera instancia, se estudió la capacidad de las distintas formulaciones de mejorar el pasaje de un colorante a través de la epidermis utilizando el modelo de EMRs [170]. Como se observó en los resultados, los liposomas por sí solos no generaron una mejora respecto a la aplicación del colorante libre. Este resultado concuerda con lo revisado por Elsayed y col., quienes describen a los liposomas convencionales como *carriers* de poco o ningún valor para el transporte de drogas por vía transdérmica, ya que no penetran profundamente la piel y se confinan en la capa superior del estrato córneo. Los autores atribuyen esta baja efectividad, entre otros factores, a la utilización de colesterol, el cual aumenta la rigidez de la vesícula, habiéndose demostrado que la disminución de este componente en las formulaciones liposomales se encuentra asociada a un incremento en el transporte de drogas a través del estrato córneo [220]. Sin embargo, al incorporar AG2-C16 a la formulación, se observó un incremento de hasta el doble de la permeabilidad del colorante libre. Hasta el momento, existe un único reporte previo, en nuestro conocimiento, del uso conjunto de un SAA de tipo *gemini* formulado en nanopartículas para la inmunización transcutánea con un antígeno proteico. Los autores demostraron la capacidad de este tipo de formulaciones de inducir una respuesta inmune humoral y celular específica, indicando la capacidad de presentación del antígeno [174]. Distintos surfactantes han sido estudiados como potenciadores de la permeabilidad cutánea debido a su capacidad para mejorar la permeación de fármacos en la piel mediante mecanismos que incluyen, entre otros, el cambio reversible de la organización lipídica del estrato córneo, con la consiguiente reducción de la resistencia a la difusión [221]. Por esta razón, distintos SAA de tipo *gemini* se han evaluado para el transporte de drogas, habiéndose reportado, por ejemplo, un incremento en la permeabilidad de dos tipos de anestesia al utilizar un *gemini* catiónico con acilos de 14-C [222]. Asimismo, otros autores reportaron que la formulación de nanopartículas utilizando este tipo de moléculas permitió una mejora en la permeabilidad cutánea de un antibiótico [223]. Aunque se ha demostrado la capacidad de los SAA de tipo *gemini* de mejorar la absorción de sustancias, no se conoce con claridad el mecanismo. Un estudio reciente en el que se evaluó la capacidad de un *gemini* para inducir la absorción intestinal de una droga en ratas, demostró que la molécula estudiada podía tanto aumentar la fluidez de las membranas celulares, como inducir la disminución de los niveles de las claudinas -1 y -4, afectando las uniones estrechas entre las células epiteliales entéricas. De esta forma, esta molécula podría inducir tanto un aumento del transporte transcelular como paracelular [224]. Si bien se requieren ensayos complementarios para conocer el mecanismo de acción ejercido por AG2-C16, los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los encontrados por otros autores. Respecto a la adición de ODN-CpG a esta formulación, se observó que disminuye la permeabilidad en relación a la utilización sólo de AG2-C16. Este mismo efecto

se observó en todas las formulaciones que incluyen al ODN-CpG como inmunoestimulante. Previamente, se ha demostrado que la permeabilidad mediada por liposomas es inversamente proporcional al tamaño de las vesículas, por lo que este efecto podría estar ligado a la presencia de los agregados de mayor tamaño presentes en estas formulaciones [225]. Respecto a la utilización de OPM, otros autores, han demostrado que la utilización de niosomas cubiertos con mananos y aplicados de forma tópica, es capaz de aumentar la respuesta inmune humoral específica hacia un antígeno proteico, respecto al uso de niosomas libres de este inmunoestimulante [203]. Por otro lado, no existen reportes sobre el efecto de su incorporación en liposomas sobre la capacidad de mejorar la permeabilidad cutánea. Por estos motivos, se debe resaltar la tendencia al incremento en la permeabilidad al utilizar la formulación Lip+OPM observada en nuestros ensayos. En conjunto, se debe destacar el aumento en el pasaje del colorante generado por algunas de las formulaciones evaluadas, ya que se trata de liposomas convencionales, los cuales se han reportado aumentan la retención de la molécula transportada en la superficie epitelial, mientras que se necesitarían de liposomas deformables para inducir el pasaje transcutáneo [226]. Con base en los resultados obtenidos y lo reportado en la bibliografía, resulta interesante continuar con la evaluación de estas formulaciones considerando incluir modificaciones en la composición lipídica de estas, para mejorar el pasaje transcutáneo.

Por último, se evaluó la capacidad de las distintas formulaciones de activar los genes codificantes de las quemoquinas CXCL1/2/3/9/10, CCL2/3/20; y de las citoquinas IL-1 α , IL-6, TNF- α e IFN- β , tanto en queratinocitos como en fibroblastos. En la Tabla 6 se encuentran resumidas las funciones de estas moléculas en la respuesta inmune.

Tabla 6: Rol de las distintas quemoquinas y citoquinas en la respuesta inmune de ratón.

Quemoquina/ Citoquina	Función	Fuente
CXCL1	Reclutamiento y activación de neutrófilos.	[227]
CXCL2	Reclutamiento y activación de neutrófilos.	[228]
CXCL3	Reclutamiento y activación de neutrófilos.	[229]
CXCL9	Reclutamiento de células NK, linfocitos Th1 y Tc efectores.	[230]
CXCL10	Reclutamiento de células NK, linfocitos Th1 y Tc efectores.	[230]
CCL2	Reclutamiento de monocitos/macrófagos.	[231]
CCL3	Reclutamiento de macrófagos. Promueve la activación y migración de linfocitos Tc.	[232]
CCL20	Reclutamiento de células dendríticas y linfocitos Th17.	[233,234]
IL-1 α	Mediador de procesos inflamatorios. Inicia la respuesta de neutrófilos en el sitio de inflamación.	[235]
IL-6	Citoquina pro y anti-inflamatoria. Reclutamiento de monocitos durante la fase aguda.	[236,237]
TNF- α	Citoquina proinflamatoria. Activación de macrófagos y perpetuación de su respuesta.	[238]
IFN- β	Citoquina antiviral. Media la activación y funciones de células NK.	[239]

NK: Natural killer.

Particularmente en fibroblastos, se observó que el OPM libre fue capaz de inducir un aumento en los niveles de expresión de todos los genes estudiados, a excepción de IFN- β que no presentó variaciones en su expresión en ninguna de las condiciones evaluadas. Esta respuesta se debería a la presencia de receptores de manosa en fibroblastos [240]. Si bien no hemos encontrado reportes en fibroblastos, se ha descrito previamente que el reconocimiento por macrófagos de los mananos presentes en *Candida albicans*, desencadenan el incremento en los niveles de CXCL1, CXCL2, IL-6, entre otras, lo que podría explicar el efecto proinflamatorio generado por este inmunoestimulante [241]. Por otro lado, al incorporarse el OPM en una formulación liposomal los niveles de expresión de todos los genes mostraron una tendencia a disminuir respecto a su utilización libre. Este efecto no se ha reportado previamente, pero podría deberse a una disminución de la concentración efectiva de manano capaz de interactuar con su receptor. Si se considera que el receptor de manosa se trata de un receptor de membrana, la simple incubación con el OPM sería suficiente para que se produzca el reconocimiento y la consiguiente activación [242]. En este estado, se puede asumir que todas las moléculas de OPM son capaces de interactuar con su receptor con la misma probabilidad. Sin embargo, al formularlo en liposomas, como hemos demostrado, este oligosacárido recubre la vesícula. Considerando que los fibroblastos fueron cultivados en monocapa, esta configuración espacial del OPM afectaría la probabilidad de interacción con su receptor. Así, por ejemplo, al generarse la interacción entre el receptor y una molécula de OPM unida a una vesícula, se impediría la interacción de los OPM dispuestos de cara opuesta a la superficie de contacto con la célula, reduciendo así el número de OPM disponibles. Si bien esto explicaría, en parte, la disminución de la respuesta en presencia de liposomas, se requieren estudios complementarios para probar este supuesto. Asimismo, y a pesar de este efecto, se debe resaltar que todas las formulaciones con OPM indujeron altos niveles de expresión de CXCL9/10 y CCL20, asociadas a la quimioatracción de linfocitos efectores de tipo Th1 y Th17, así como de linfocitos Tc al sitio de infección [230,234]. Por último, se deben resaltar los resultados obtenidos para el ODN-CpG, el cual, si bien es un inductor del perfil Th1, no fue capaz de aumentar la expresión de CXCL9, principal quimioattractante de este tipo celular, cuando fue usado en forma libre, sino que fue necesaria su incorporación en formulaciones liposomales para observar este efecto. En particular, la formulación conjunta del oligonucleótido con AG2-C16 en liposomas resulta en un incremento notable de la expresión de CXCL9, lo que deja entrever nuevamente la capacidad del SAA probado de potenciar el efecto inmunoestimulante del ODN-CpG. La incapacidad de un ODN-CpG libre de inducir el aumento de CXCL9 en fibroblastos fue reportada previamente por otros autores [243]. Sin embargo, otros autores han publicado, que los ODN-CpG en conjunto con liposomas, son capaces de interactuar con el TLR9 e inducir la producción tanto de CXCL9 como de CXCL10 en otros tipos celulares, demostrando su capacidad de favorecer la migración de los linfocitos Th1 [244]. Basados en estos antecedentes, podemos sugerir que, en nuestros ensayos, la formulación del ODN-CpG formulado en liposomas, podría

mejorar el ingreso del oligonucleótido a los fibroblastos, para así ser reconocido por TLR9, receptor también presente en este tipo celular, desencadenando el aumento en CXCL9 [245].

Respecto al estudio en queratinocitos, ninguna de las condiciones evaluadas fue capaz de generar modificaciones en los niveles de expresión de ninguno de los parámetros incluidos en este estudio. Sin embargo, previamente se ha reportado el uso de la secuencia CpG 1826, en este caso con enlaces fosforotioato, en la activación de queratinocitos. Este oligonucleótido se probó en un rango de concentraciones, incluido el evaluado en nuestro ensayo y demostró incrementar la producción de citoquinas proinflamatorias luego de 48 horas [246]. Otros autores reportaron que el ODN-CpG 1826 fue capaz de incrementar los niveles de IL-1 α y TNF- α en queratinocitos luego de 72 horas de cultivo [247]. Por otro lado, se ha descrito que el reconocimiento de PAMPs mediado por lectinas de unión a manosa en queratinocitos estaría asociado al incremento de CXCL1 [248]. Sin embargo, no hemos encontrado reportes de ensayos semejantes a los realizados en este trabajo. Por este motivo, será necesario continuar y repetir los estudios realizados considerando la posibilidad de incorporar modificaciones en los protocolos empleados, como tiempo de incubación y concentración de los distintos inmunoestimulantes.

CONCLUSIONES

En esta etapa del trabajo se obtuvo una serie de formulaciones compuestas por liposomas cargados con distintos inmunoestimulantes. Respecto a su caracterización, fue posible demostrar que a pesar de los cambios en el potencial zeta generados por la adición de cada inmunoestimulante, no se observaron cambios en la morfología, manteniéndose la conformación de vesículas esféricas. Asimismo, no se evidenciaron grandes cambios en el diámetro de las bicapas lipídicas, lo que muestra que el método de inyección etanólica, seguido del agregado de los inmunoestimulantes a las vesículas preformadas, conduce a que estos últimos queden en el exterior de los liposomas y, por consiguiente, expuestos para su correcto reconocimiento por los receptores del sistema inmune. Por otro lado, se observó que la inestabilidad conferida a las formulaciones por la adición del ODN-CpG, se debe a un aumento en el agregado de las vesículas, efecto que puede disminuirse con la utilización conjunta de AG2-C16 en la formulación. A su vez, se determinó que los liposomas obtenidos son capaces de brindar protección al oligonucleótido ante la acción de ADNasas, permitiendo utilizar ODN-CpG con enlaces naturales, biocompatibles y de bajo costo como inmunoestimulante.

En cuanto a la respuesta inmune estudiada para cada formulación, se concluye que luego de la administración de dos dosis, los tres inmunoestimulantes probados, ODN-CpG, AG2-C16 y OPM, al ser formulados en liposomas son capaces de estimular una respuesta inmune hacia un antígeno proteico. La respuesta humoral se caracterizó, en todos los casos, por altos títulos de IgG específicas, con altos niveles de ambos subtipos, IgG1 e IgG2a o IgG2c, según la cepa de ratones utilizada, BALB/c o C57BL/6J, respectivamente. Asimismo, en los ensayos realizados en BALB/c, se pudo comprobar que las formulaciones liposomales generaron un aumento en los niveles de IgG en lavado vaginal, con ausencia de IgA específica. Respecto a la respuesta celular, si bien todas las formulaciones evaluadas demostraron incrementarla respecto a la utilización del antígeno libre, resultan especialmente interesante los resultados obtenidos ante el uso concomitante de AG2-C16 y ODN-CpG. La formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA, en ratones de la cepa BALB/c, fue capaz de inducir los tres perfiles celulares evaluados Th1, Th2 y Th17, con presencia de linfocitos Tc productores de IFN- γ . Hasta el momento, y basados tanto en los resultados obtenidos como en los antecedentes encontrados, es posible sugerir que la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA induciría una respuesta inmune con el perfil deseado para el control de las infecciones causadas por *S. aureus*.

Por último, se estudió la capacidad de las distintas formulaciones como adyuvante en la inmunización por vía transdérmica. Sobre este punto, se concluye que la incorporación de AG2-C16 a la formulación liposomal es capaz de incrementar el pasaje del colorante a través de EMR, permitiendo considerar a la formulación Lip+AG2-C16 como sistema de *delivery* para la

administración tópica de principios activos. Un efecto semejante se observó al utilizar OPM, aunque con mayor dispersión, por lo que se requiere continuar con su evaluación. Asimismo, se observó que la incorporación de ODN-CpG dificultaría la penetración del epitelio en las formulaciones que lo contienen, disminuyendo el porcentaje de colorante transportado respecto a la misma formulación libre de oligonucleótidos. Por otro lado, se demostró que las formulaciones que contienen OPM como inmunoestimulante son capaces de estimular la expresión de quemoquinas y citoquinas proinflamatorias en fibroblastos. Principalmente, se debe resaltar la capacidad de este inmunoestimulante de incrementar los niveles de expresión de quimioattractantes de linfocitos Th1, Th17 y Tc, así como de neutrófilos considerando la necesidad de su reclutamiento para el control efectivo de *S. aureus* en el sitio de infección. Sin embargo, teniendo en cuenta que estas formulaciones no fueron efectivas en la activación de queratinocitos, ni en el transporte de proteína a través de EMR, podría considerarse su utilización en la vacunación mediante microinyección o por vía intradérmica. Asimismo, podría considerarse la posibilidad de una formulación que incluya tanto a OPM como a AG2-C16, aprovechando los beneficios de la utilización de cada uno de ellos. Por último, se debe destacar que, si bien estos ensayos han sido una primera aproximación al uso de las formulaciones estudiadas como adyuvantes por vía transcutánea, han dado lugar a resultados sumamente prometedores sobre los que se podrá continuar trabajando.

CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de tesis permitió el estudio de nuevos vehículos y adyuvantes, basados en liposomas catiónicos, y su aplicación en la inmunización de antígenos recombinantes de *S. aureus* en diferentes modelos experimentales.

Por un lado, se estudió la respuesta inmune generada en terneras, vaquillonas y vacas preñadas tras la inmunización con una vacuna prototípica a subunidades, formulada a partir de antígenos recombinantes y un adyuvante liposomal complementado con un ODN-CpG con enlaces naturales, como inmunoestimulante. Los resultados obtenidos, nos permitieron concluir, que es posible inducir una respuesta inmune humoral específica en bovinos, capaz de bloquear distintos factores de virulencia de *S. aureus*, a partir de la administración de una vacuna con el diseño antes mencionado. Sin embargo, las características de la respuesta inmune montada dependerían del plan de inmunización utilizado. Esto nos permite sugerir, para ensayos futuros, la implementación de planes de vacunación que comiencen a temprana edad, seguida de la aplicación de refuerzos periódicos, como una estrategia para la obtención de una respuesta inmune con mayores niveles de anticuerpos en suero y leche, y presencia de IgG2 específica al parto, momento de mayor susceptibilidad a contraer infecciones intramamarias. Se debe resaltar también, que la capacidad del adyuvante probado de inducir una respuesta inmune de memoria, permite, al utilizarse un plan de inmunización temprano, la aplicación de un único refuerzo previo al parto, lo que conduciría a un manejo más simple de los animales en esta etapa.

Por otro lado, obtuvimos diversas formulaciones liposomales que contenían distintos inmunoestimulantes. Estas formulaciones fueron caracterizadas y se estudió su capacidad, tanto de inducir una respuesta inmune eficiente y específica contra el antígeno rClfA de *S. aureus*, en un modelo experimental murino, como de actuar como vehículo y adyuvante en la administración transdérmica e intradérmica de vacunas. En todas las formulaciones obtenidas, se mantuvo la conformación esférica de las vesículas, propia de los liposomas. Además, se demostró que los liposomas son capaces de brindar protección al ODN-CpG ante la acción de ADNasas, permitiendo utilizar oligonucleótidos con enlaces naturales, biocompatibles y de bajo costo como inmunoestimulante. Asimismo, se observó que la utilización conjunta de AG2-C16 podría disminuir la inestabilidad conferida a las formulaciones por la adición del ODN-CpG a los liposomas catiónicos. Respecto a la respuesta inmune inducida en ratones por estas formulaciones, se concluyó que los tres inmunoestimulantes formulados en liposomas, ODN-CpG, AG2-C16 y OPM, son capaces de estimular una respuesta inmune hacia un antígeno proteico. En todos los casos, la respuesta inmune humoral se caracterizó por altos títulos de IgG específicas en sangre, con presencia de ambos subtipos, IgG1 e IgG2a o IgG2c, y por un aumento en los niveles de IgG en lavado vaginal, con ausencia de IgA específica. Respecto a la respuesta

celular, se deben resaltar los resultados obtenidos ante el uso concomitante de AG2-C16 y ODN-CpG en liposomas, formulación capaz de inducir los tres perfiles celulares evaluados Th1, Th2 y Th17, con presencia de linfocitos Tc productores de IFN- γ . Considerando que esta respuesta inmune coincide con el perfil deseado para el control de las infecciones causadas por *S. aureus*, a partir de los resultados obtenidos en la presente tesis, sugerimos al adyuvante Lip+AG2-C16+ODN-CpG como un potencial candidato para posteriores ensayos en bovinos. A su vez, basados en el incremento inducido, por esta formulación, de los niveles de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ , nos permitimos proponer este adyuvante como una alternativa en el diseño de vacunas para la prevención de infecciones virales o cáncer.

Por último, en cuanto a la capacidad de las distintas formulaciones como adyuvante en la inmunización por vía transdérmica, los resultados nos permiten considerar a la formulación Lip+AG2-C16 como sistema de *delivery* para la administración tópica de principios activos. Mientras que la incorporación de OPM a las formulaciones, mejora la capacidad inmunoestimulante de la formulación, estimulando la expresión de quemoquinas y citoquinas proinflamatorias en fibroblastos, pero no así, en queratinocitos. Entre las quemoquinas estimuladas, se encontraron quimioattractantes de linfocitos Th1, Th17 y Tc, y de neutrófilos, que pueden resultar en un reclutamiento celular clave para el control efectivo de *S. aureus* en el sitio de infección. Estos resultados nos permiten sugerir el uso de formulaciones que contengan OPM en modelos de inmunización mediante microinyección o por vía intradérmica. Asimismo, podría considerarse, en ensayos futuros, la utilización de una formulación que incluya tanto a OPM como a AG2-C16, para su aplicación en modelos de inmunización por vía transcutánea.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis, permiten demostrar que los liposomas catiónicos constituyen un sistema adyuvante de gran versatilidad, que permite la selección de los inmunoestimulantes a incluir, en función de las características de la respuesta inmune que se necesita inducir. A futuro, la disponibilidad de una plataforma que permita la producción de vehículos a medida, podría representar una ventaja en la búsqueda del diseño racional de vacunas orientadas a la profilaxis de enfermedades infecciosas causadas tanto en animales, como en el Hombre.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S Langsrud (2009) 9 - Biofilm formation by Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* and *Enterococcus* spp. in food processing environments, en: *Biofilms in the Food and Beverage Industries*, (Eds.: PM Fratamico, BA Annous, NW Gunther), Woodhead Publishing, pp. 250–269.
- [2] AS Anderson, AA Miller, RGK Donald, IL Scully, JS Nanra, D Cooper, KU Jansen (2012) Development of a multicomponent *Staphylococcus aureus* vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors. *Hum Vaccin Immunother* 8 (11), 1585–1594.
- [3] C Harro, R Betts, W Orenstein, E-J Kwak, HE Greenberg, MT Onorato, J Hartzel, J Lipka, MJ DiNubile, N Kartsonis (2010) Safety and Immunogenicity of a Novel *Staphylococcus aureus* Vaccine: Results from the First Study of the Vaccine Dose Range in Humans. *Clin Vaccine Immunol* 17 (12), 1868–1874.
- [4] A Joshi, TB McNeely (2013) Developing a Universal *Staphylococcus aureus* Vaccine: Why Aren't We There Yet? *Internal Medicine: Open Access* 3 (2), 1–7.
- [5] LF Calvinho, L Tirante (2005) Prevalencia de Microorganismos Patógenos de Mastitis Bovina y Evolución del Estado de Salud de la Glándula Mamaria en Argentina en los Últimos 25 Años. *FAVE Cs Vet* 4 (1/2), 29–40.
- [6] A Zecconi, L Fox, L Calvinho (2006) *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin of the International Dairy Federation* (408), 1–36.
- [7] HF Chambers (2016) Staphylococcal infections, en: *Goldman-Cecil Medicine*, (Eds.: L Goldman, AI Schafer), 25th ed., pp. 1815–1819.
- [8] DC Dugdale (n.d.) Cuidados personales en casa - infecciones por estafilococos: MedlinePlus enciclopedia médica. *MedlinePlus*. Último acceso septiembre 2020: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000686.htm>
- [9] AJ Ayliffe (1996) Recommendations for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *WHO/EMC/LTS/96.1*.
- [10] SYC Tong, JS Davis, E Eichenberger, TL Holland, VG Fowler (2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28 (3), 603–661.
- [11] TJ Foster (2017) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev* 41 (3), 430–449.
- [12] H Humphreys (2009) Do guidelines for the prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* make a difference? *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 7 39–43.
- [13] EY Klein, W Jiang, N Mojica, KK Tseng, R McNeill, SE Cosgrove, TM Perl (2019) National Costs Associated With Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospitalizations in the United States, 2010–2014. *Clin Infect Dis* 68 (1), 22–28.
- [14] A Yuasa, T Murata, K Imai, Y Yamamoto, Y Fujimoto (2019) Treatment procedures and associated medical costs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Japan: A retrospective analysis using a database of Japanese employment-based health insurance. *SAGE Open Med* 7.
- [15] FD Lowy (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339 (8), 520–532.
- [16] CM Camussone, LF Calvinho (2013) Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología* 45 (2), 119–130.
- [17] T Fowler, ER Wann, D Joh, S Johansson, TJ Foster, M Höök (2000) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell Biol.* 79 (10), 672–679.
- [18] J Josse, F Laurent, A Diot (2017) Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front. Microbiol.* 8:2433.

- [19] N Alva-Murillo, JE López-Meza, A Ochoa-Zarzosa (2014) Nonprofessional Phagocytic Cell Receptors Involved in *Staphylococcus aureus* Internalization. *Biomed Res Int* 2014:538546.
- [20] J Hawiger, S Timmons, DD Strong, BA Cottrell, M Riley, RF Doolittle (1982) Identification of a region of human fibrinogen interacting with staphylococcal clumping factor. *Biochemistry* 21 (6), 1407–1413.
- [21] J Higgins, A Loughman, KPM van Kessel, JAG van Strijp, TJ Foster (2006) Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 258 (2), 290–296.
- [22] D Grumann, U Nübel, BM Bröker (2014) *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 21 583–592.
- [23] J Bien, O Sokolova, P Bozko (2011) Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog* 2011:601905.
- [24] D Oliveira, A Borges, M Simões (2018) *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins (Basel)* 10 (6):252.
- [25] O Goldmann, L Tuchscher, M Rohde, E Medina (2016) α -Hemolysin enhances *Staphylococcus aureus* internalization and survival within mast cells by modulating the expression of β 1 integrin. *Cell. Microbiol.* 18 (6), 807–819.
- [26] MB Mestre, CM Fader, C Sola, MI Colombo (2010) Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy* 6 (1), 110–125.
- [27] M Huseby, K Shi, CK Brown, J Digre, F Mengistu, KS Seo, GA Bohach, PM Schlievert, DH Ohlendorf, CA Earhart (2007) Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 189 (23), 8719–8726.
- [28] CM Camussone, N Pujato, MS Renna, CM Veaute, B Morein, IS Marcipar, LF Calvino (2014) Immune response and functional role of antibodies raised in heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 lysate and recombinant antigens vaccine formulated with Iscom Matrix adjuvant. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 162 (3–4), 96–107.
- [29] JA McCullers (2007) Evolution, benefits, and shortcomings of vaccine management. *J Manag Care Pharm* 13 (7 Suppl B), S2-6.
- [30] A Tagliabue, R Rappuoli (2018) Changing Priorities in Vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. *Front Immunol* 9:1068.
- [31] S Ansari, RK Jha, SK Mishra, BR Tiwari, AM Asaad (2019) Recent advances in *Staphylococcus aureus* infection: focus on vaccine development. *Infect Drug Resist* 12 1243–1255.
- [32] F Bagnoli, S Bertholet, G Grandi (2012) Inferring Reasons for the Failure of *Staphylococcus aureus* Vaccines in Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol* 2.
- [33] BK Giersing, SS Dastgheyb, K Modjarrad, V Moorthy (2016) Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 34 (26), 2962–2966.
- [34] TB McNeely, NA Shah, A Fridman, A Joshi, JS Hartzel, RS Keshari, F Lupu, MJ DiNubile (2014) Mortality among recipients of the Merck V710 *Staphylococcus aureus* vaccine after postoperative *S. aureus* infections: An analysis of possible contributing host factors. *Hum Vaccin Immunother* 10 (12), 3513–3516.
- [35] CS Schmidt, CJ White, AS Ibrahim, SG Filler, Y Fu, MR Yeaman, JE Edwards, JP Hennessey (2012) NDV-3, a recombinant alum-adsjuvanted vaccine for *Candida* and *Staphylococcus aureus*, is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine* 30 (52), 7594–7600.
- [36] J Levy, L Licini, E Haelterman, P Moris, P Lestrade, S Damaso, P Van Belle, D Boutriau (2015) Safety and immunogenicity of an investigational 4-component *Staphylococcus aureus* vaccine with or without AS03B adjuvant: Results of a randomized phase I trial. *Hum Vaccin Immunother* 11 (3), 620–631.
- [37] A Gurtman, E Begier, N Mohamed, J Baber, C Sabharwal, RM Haupt, H Edwards, D Cooper, KU Jansen, AS Anderson (2019) The development of a *Staphylococcus aureus*

- four antigen vaccine for use prior to elective orthopedic surgery. *Hum Vaccin Immunother* 15 (2), 358–370.
- [38] J Clowry, AD Irvine, RM McLoughlin (2019) Next-generation anti-*Staphylococcus aureus* vaccines: A potential new therapeutic option for atopic dermatitis? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143 (1), 78–81.
- [39] C Maisonneuve, S Bertholet, DJ Philpott, E De Gregorio (2014) Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (34), 12294–12299.
- [40] N Garçon, G Leroux-Roels, W-F Cheng (2011) Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology* 1 (1), 89–113.
- [41] JC Aguilar, EG Rodríguez (2007) Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25 (19), 3752–3762.
- [42] A Di Pasquale, S Preiss, F Tavares Da Silva, N Garçon (2015) Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines (Basel)* 3 (2), 320–343.
- [43] B Laupèze, C Hervé, A Di Pasquale, F Tavares Da Silva (2019) Adjuvant Systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine* 37 (38), 5670–5680.
- [44] S Akira (2011) Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366 (1579), 2748–2755.
- [45] T Kawai, S Akira (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 21 (4), 317–337.
- [46] L Wang, JC Lee (2015) 18 - *Staphylococcus aureus*, en: *Advanced Vaccine Research Methods for the Decade of Vaccines*, (Eds.: F Bagnoli, R Rappuoli) Caister Academic Press, pp. 425–448.
- [47] J de S Apostólico, VAS Lunardelli, FC Coirada, SB Boscardin, DS Rosa (2016) Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J Immunol Res* 2016 :1459394.
- [48] Y Burakova, R Madera, S McVey, JR Schlup, J Shi (2018) Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunol.* 31 (1), 11–22.
- [49] TJD Knight-Jones, K Edmond, S Gubbins, DJ Paton (2014) Veterinary and human vaccine evaluation methods. *Proc Biol Sci* 281 (1784):20132839.
- [50] G Gregoriadis (1990) Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today* 11 (3), 89–97.
- [51] L Leserman (2004) Liposomes as protein carriers in immunology. *J Liposome Res* 14 (3–4), 175–189.
- [52] A Akbarzadeh, R Rezaei-Sadabady, S Davaran, SW Joo, N Zarghami, Y Hanifehpour, M Samiei, M Kouhi, K Nejati-Koshki (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 8 (1), 102.
- [53] M-G Kim, JY Park, Y Shon, G Kim, G Shim, Y-K Oh (2014) Nanotechnology and vaccine development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9 (5), 227–235.
- [54] J Li, X Wang, T Zhang, C Wang, Z Huang, X Luo, Y Deng (2015) A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 10 (2), 81–98.
- [55] L Zhao, A Seth, N Wibowo, C-X Zhao, N Mitter, C Yu, APJ Middelberg (2014) Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32 (3), 327–337.
- [56] A Laouini, C Jaafar-Maalej, I Limayem-Blouza, S Sfar, C Charcosset, H Fessi (2012) Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Coll Sci Biotech* 1 (2), 147–168.
- [57] MC Smith, RM Crist, JD Clogston, SE McNeil (2017) Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem* 409 (24), 5779–5787.
- [58] P Walde (2004) Preparation of Vesicles (Liposomes), en: *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, (Ed.: HS Nalwa), American Scientific Publishers, pp. 43–79.

- [59] X Liu, G Huang (2013) Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 8 (6), 319–328.
- [60] SR Mudshinge, AB Deore, S Patil, CM Bhalgat (2011) Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm J* 19 (3), 129–141.
- [61] M-R Toh, GNC Chiu (2013) Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 8 (2), 88–95.
- [62] AG Allison, G Gregoriadis (1974) Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 252 (5480), 252.
- [63] SM Sivakumar, MM Safhi, M Kannadasan, N Sukumaran (2011) Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharm J* 19 (4), 197–206.
- [64] S Tandrup Schmidt, C Foged, K Smith Korsholm, T Rades, D Christensen (2016) Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators. *Pharmaceutics* 8 (1), 7.
- [65] Y Perrie, F Crofts, A Devitt, HR Griffiths, E Kastner, V Nadella (2016) Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99 (Pt A), 85–96.
- [66] RA Schwendener (2014) Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* 2 (6), 159–182.
- [67] IG Reidel, MI García, V González, A Giorello, LF Calvinho, AM Gennaro, CM Veaute (2017) Effects of the liposomal co-encapsulation of antigen and PO-CpG oligonucleotide on immune response in mice. *International Journal For Research In Applied And Natural Science* 3 (6), 01–19.
- [68] D Kim, S Kwon, C-S Ahn, Y Lee, S-Y Choi, J Park, H-Y Kwon, H-J Kwon (2011) Adjuvant effect of liposome-encapsulated natural phosphodiester CpG-DNA. *BMB Rep* 44 (11), 758–763.
- [69] A Bradley (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164 (2), 116–128.
- [70] K Thompson-Crispi, H Atalla, F Miglior, BA Mallard (2014) Bovine Mastitis: Frontiers in Immunogenetics. *Front. Immunol.* 5.
- [71] S Dufour, J Labrie, M Jacques (2019) The Mastitis Pathogens Culture Collection. *Microbiol Resour Announc* 8 (15), e00133-19.
- [72] SC Nickerson, RM Akers (2011) MAMMARY GLAND | Anatomy, en: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2da ed., (Eds.: JW Fuquay, PF Fox, PLH McSweeney), Elsevier, pp. 328–337.
- [73] N Sharma, DK Jeong (2013) Stem cell research: a novel boulevard towards improved bovine mastitis management. *Int. J. Biol. Sci.* 9 (8), 818–829.
- [74] C Viguier, S Arora, N Gilmartin, K Welbeck, R O’Kennedy (2009) Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology* 27 (8), 486–493.
- [75] DK Swain, MS Kushwah, M Kaur, AK Dang (2015) Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*. *Vet World* 8 (3), 336–345.
- [76] Z Wei, J Wang, Y Wang, C Wang, X Liu, Z Han, Y Fu, Z Yang (2019) Effects of Neutrophil Extracellular Traps on Bovine Mammary Epithelial Cells in vitro. *Front. Immunol.* 10:1003.
- [77] HD Gresham, JH Lowrance, TE Caver, BS Wilson, AL Cheung, FP Lindberg (2000) Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection. *The Journal of Immunology* 164 (7), 3713–3722.
- [78] RMC Deshapriya, R Rahularaj, RMSBK Ransinghe (2019) Mastitis, somatic cell count and milk quality: an overview. *Sri Lanka Veterinary Journal* 66 (1), 1–12.
- [79] T Halasa, K Huijps, O Østerås, H Hogeveen (2007) Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 29 (1), 18–31.
- [80] C Vissio, DA Agüero, CG Raspani, LM Odierno, AJ Larriestra (2015) Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de

- su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *Archivos de Medicina Veterinaria* 47 (1), 7–14.
- [81] NMC (n.d.) NMC Recommended Mastitis Control Program (International version). *National Mastitis Council*. Último acceso septiembre 2020: <https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2020/04/RECOMMENDED-MASTITIS-CONTROL-PROGRAM-International.pdf>
- [82] LM Negri, MV Aimar, Eds. (2019) Guía de buenas prácticas para establecimientos lecheros: material de referencia de la red de BPA. Ediciones INTA.
- [83] KP Haran, SM Godden, D Boxrud, S Jawahir, JB Bender, S Sreevatsan (2012) Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (3), 688–695.
- [84] RD Abdi, BE Gillespie, J Vaughn, C Merrill, SI Headrick, DB Ensermu, DH D'Souza, GE Agga, RA Almeida, SP Oliver, O Kerro Dego (2018) Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates from Dairy Cows and Genetic Diversity of Resistant Isolates. *Foodborne Pathogens and Disease* 15 (7), 449–458.
- [85] MF Anjum, F Marco-Jimenez, D Duncan, C Marín, RP Smith, SJ Evans (2019) Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Animals and Animal Products in the UK. *Front Microbiol* 10:2136.
- [86] R Boss, A Cosandey, M Luini, K Artursson, M Bardiau, F Breitenwieser, E Hehenberger, Th Lam, M Mansfeld, A Michel, G Mösslacher, J Naskova, S Nelson, O Podpečan, A Raemy, E Ryan, O Salat, P Zangerl, A Steiner, HU Graber (2016) Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of Dairy Science* 99 (1), 515–528.
- [87] RT Rao, K Jayakumar, P Kumar (2017) Bovine origin *Staphylococcus aureus*: A new zoonotic agent? *Vet World* 10 (10), 1275–1280.
- [88] JR Middleton, CD Luby, DS Adams (2009) Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Veterinary Microbiology* 134 (1), 192–198.
- [89] A Prenafeta, R March, A Foix, I Casals, L Costa (2010) Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134 (3–4), 208–217.
- [90] UP Pereira, DGS Oliveira, LR Mesquita, GM Costa, LJ Pereira (2011) Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Veterinary Microbiology* 148 (2), 117–124.
- [91] SC Nickerson (2012) Managing Mastitis in Heifers: An Initial Step in Improving Dairy Herd Health, en: *Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health*, (Ed.: N Chaiyabutr), IntechOpen, pp. 333-358.
- [92] SC Nickerson, WE Owens, GM Tomita, PW Widel (1999) Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving. *Large Animal Practice* 20 16–28.
- [93] JR Middleton, J Ma, CL Rinehart, VN Taylor, CD Luby, BJ Steevens (2006) Efficacy of different Lysigin™ formulations in the prevention of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy heifers. *Journal of Dairy Research* 73 (1), 10–19.
- [94] CD Luby, JR Middleton, J Ma, CL Rinehart, S Bucklin, C Kohler, JW Tyler (2007) Characterization of the antibody isotype response in serum and milk of heifers vaccinated with a *Staphylococcus aureus* bacterin (Lysigin). *J. Dairy Res.* 74 (2), 239–246.
- [95] YH Schukken, V Bronzo, C Locatelli, C Pollera, N Rota, A Casula, F Testa, L Scaccabarozzi, R March, D Zalduendo, R Guix, P Moroni (2014) Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *J. Dairy Sci.* 97 (8), 5250–5264.
- [96] H Landin, MJ Mörk, M Larsson, KP Waller (2015) Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. *Acta Vet Scand* 57:81.

- [97] M Freick, Y Frank, K Steinert, A Hamedy, O Passarge, A Sobiraj (2016) Mastitis vaccination using a commercial polyvalent vaccine or a herd-specific *Staphylococcus aureus* vaccine. Results of a controlled field trial on a dairy farm. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 44 (4), 219–229.
- [98] AJ Bradley, JE Breen, B Payne, V White, MJ Green (2015) An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. *Journal of Dairy Science* 98 (3), 1706–1720.
- [99] S Piepers, A Prenafeta, J Verbeke, A De Visscher, R March, S De Vliegher (2017) Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. *Journal of Dairy Science* 100 (1), 769–782.
- [100] F Scali, C Camussone, LF Calvino, M Cipolla, A Zeconi (2015) Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? *Res. Vet. Sci.* 100 88–99.
- [101] P Gilot, G Lina, T Cochard, B Poutrel (2002) Analysis of the Genetic Variability of Genes Encoding the RNA III-Activating Components Agr and TRAP in a Population of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis. *J Clin Microbiol* 40 (11), 4060–4067.
- [102] JR Middleton (2008) *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 7 (6), 805–815.
- [103] MI Gómez, DO Sordelli, FR Buzzola, VE García (2002) Induction of cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. *Infect. Immun.* 70 (8), 4254–4260.
- [104] H Wallemacq, D Bedoret, J Pujol, C Desmet, P-V Drion, F Farnir, J Mainil, P Lekeux, F Bureau, L Fiévez (2012) CD40 triggering induces strong cytotoxic T lymphocyte responses to heat-killed *Staphylococcus aureus* immunization in mice: a new vaccine strategy for staphylococcal mastitis. *Vaccine* 30 (12), 2116–2124.
- [105] RJ Yancey (1999) Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. *Adv Vet Med* 41 257–273.
- [106] Y Kim, H Atalla, B Mallard, C Robert, N Karrow (2011) Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research* 7 (1), 51.
- [107] RA Proctor (2012) Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? *Vaccine* 30 (19), 2921–2927.
- [108] SP Oliver, BE Gillespie, SJ Headrick, MJ Lewis, HH Dowlen (2005) Prevalence, Risk Factors, and Strategies for Controlling Mastitis in Heifers During the Periparturient Period. *Vet Res* 36 (2), 13.
- [109] L Benedictus, L Ravesloot, K Poppe, I Daemen, E Boerhout, J van Strijp, F Broere, V Rutten, A Koets, S Eisenberg (2019) Immunization of young heifers with staphylococcal immune evasion proteins before natural exposure to *Staphylococcus aureus* induces a humoral immune response in serum and milk. *BMC Veterinary Research* 15 (1), 15.
- [110] N Pujato, CM Camussone, MS Renna, MS Perrig, B Morein, LF Calvino, IS Marcipar (2018) Evaluation of the humoral immune response to a multicomponent recombinant vaccine against *S. aureus* in healthy pregnant heifers. *The Veterinary Journal* 235 47–53.
- [111] A Wagner, M Platzgummer, G Kreismayr, H Quendler, G Stiegler, B Ferko, G Vecera, K Vorauer-Uhl, H Katinger (2006) GMP production of liposomes--a new industrial approach. *J Liposome Res* 16 (3), 311–319.
- [112] K Yang, JT Delaney, US Schubert, A Fahr (2012) Fast high-throughput screening of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanol injection method. *J Liposome Res* 22 (1), 31–41.
- [113] M Mulongo, T Prysliak, J Perez-Casal (2013) Vaccination of feedlot cattle with extracts and membrane fractions from two *Mycoplasma bovis* isolates results in strong humoral immune responses but does not protect against an experimental challenge. *Vaccine* 31 (10), 1406–1412.

- [114] T Schennings, A Heimdahl, K Coster, J-I Flock (1993) Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microbial Pathogenesis* 15 (3), 227–236.
- [115] A Ismail (2012) Purification of fibrinogen from human plasma, Tesis de Master. Director: WH Velander, University of Nebraska.
- [116] DKR Low, JH Freer (1977) The purification of β -lysin (spingomyelinase C) from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 2 (3), 139–143.
- [117] S Vandana, M Raje, MV Krishnasastri (1997) The role of the amino terminus in the kinetics and assembly of alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 272 (40), 24858–24863.
- [118] T Wadström, R Möllby (1971) Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*: VI. Production and purification of β -haemolysin in large scale. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 242 (1), 288–307.
- [119] Federation of Animal Science Societies (FASS) (2010) Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching. 3th ed. Federation of Animal Science Societies.
- [120] VH Shargh, MR Jaafari, A Khamesipour, I Jaafari, SA Jalali, A Abbasi, A Badiie (2012) Liposomal SLA co-incorporated with PO CpG ODNs or PS CpG ODNs induce the same protection against the murine model of leishmaniasis. *Vaccine* 30 (26), 3957–3964.
- [121] PMH Heegaard, L Dedieu, N Johnson, M-F Le Potier, M Mockey, F Mutinelli, T Vahlenkamp, M Vascellari, NS Sørensen (2011) Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Arch. Virol.* 156 (2), 183–202.
- [122] FL Parra, MJ Morilla, EL Romero (2020) Toll like receptors agonists-based nanomedicines as veterinary immunotherapies. *Prnano* 577–607.
- [123] A Thakur, C Aagaard, A Stockmarr, P Andersen, G Jungersen (2013) Cell-Mediated and Humoral Immune Responses after Immunization of Calves with a Recombinant Multiantigenic *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Subunit Vaccine at Different Ages. *Clin Vaccine Immunol* 20 (4), 551–558.
- [124] LM Sordillo, KL Streicher (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7 (2), 135–146.
- [125] MR Williams, P Millar (1978) Changes in IgG2 levels with age in British cattle. *Res Vet Sci* 25 (1), 82–85.
- [126] S Kamstrup, D Verthelyi, DM Klinman (2001) Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Veterinary Microbiology* 78 (4), 353–362.
- [127] A Mena, AK Nichani, Y Popowych, XP Ioannou, DL Godson, GK Mutwiri, R Hecker, LA Babiuk, P Griebel (2003) Bovine and ovine blood mononuclear leukocytes differ markedly in innate immune responses induced by Class A and Class B CpG-oligodeoxynucleotide. *Oligonucleotides* 13 (4), 245–259.
- [128] JE Butler, ME Kehrli (2005) Immunoglobulins and Immunocytes in the Mammary Gland and Its Secretions, en: *Mucosal Immunology*, (Eds.: J Mestecky, M Lamm, W Strober, J Bienenstock, JR McGhee, L Mayer), 3rd ed., Elsevier Academic Press, pp. 1763–1793.
- [129] B Fernández, A Jolly, S Colavecchia, E Fernández, SL Mundo (2011) Efecto de la infección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en la producción de anticuerpos bovinos. *InVet* 13 (1), 09–17.
- [130] H Rabbani, WR Brown, JE Butler, L Hammarström (1997) Genetic polymorphism of the *IGHG3* gene in cattle. *Immunogenetics* 46 (4), 326–331.
- [131] JP Caffin, B Poutrel (1988) Physiological and Pathological Factors Influencing Bovine Immunoglobulin G2 Concentration in Milk. *Journal of Dairy Science* 71 (8), 2035–2043.
- [132] MJ Paape, DD Bannerman, X Zhao, J-W Lee (2003) The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34 (5), 597–627.
- [133] ML Nordhaug, LL Nesse, NL Norcross, R Gudding (1994) A Field Trial with an Experimental Vaccine Against *Staphylococcus aureus* Mastitis in Cattle. 2. Antibody Response. *Journal of Dairy Science* 77 (5), 1276–1284.

- [134] ML Landrum, T Lalani, M Niknian, JD Maguire, DR Hospenthal, A Fattom, K Taylor, J Fraser, K Wilkins, MW Ellis, PD Kessler, REF Fahim, DR Tribble (2016) Safety and immunogenicity of a recombinant *Staphylococcus aureus* α -toxoid and a recombinant Panton-Valentine leukocidin subunit, in healthy adults. *Hum Vaccin Immunother* 13 (4), 791–801.
- [135] C Pozzi, K Wilk, JC Lee, M Gening, N Nifantiev, GB Pier (2012) Opsonic and Protective Properties of Antibodies Raised to Conjugate Vaccines Targeting Six *Staphylococcus aureus* Antigens. *PLOS ONE* 7 (10), e46648.
- [136] BJ Berube, J Bubeck Wardenburg (2013) *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins (Basel)* 5 (6), 1140–1166.
- [137] C Tkaczyk, L Hua, R Varkey, Y Shi, L Dettinger, R Woods, A Barnes, RS MacGill, S Wilson, P Chowdhury, CK Stover, BR Sellman (2012) Identification of Anti-Alpha Toxin Monoclonal Antibodies That Reduce the Severity of *Staphylococcus aureus* Dermonecrosis and Exhibit a Correlation between Affinity and Potency. *Clin Vaccine Immunol* 19 (3), 377–385.
- [138] C Kong, H Neoh, S Nathan (2016) Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins (Basel)* 8 (3), 72.
- [139] J Pooja, S Ajit (2010) *Staphylococcus aureus* β -hemolysin-neutralizing single-domain antibody isolated from phage display library of Indian desert camel. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3 (1), 1-7.
- [140] Y Hayakawa, M Akagi, M Hayashi, T Shimano, H Komae, O Funaki, T Kaidoh, S Takeuchi (2000) Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cows. *Veterinary Microbiology* 72 (3), 321–327.
- [141] E Boerhout, M Vrieling, L Benedictus, I Daemen, L Ravesloot, V Rutten, P Nuijten, J van Strijp, A Koets, S Eisenberg (2015) Immunization routes in cattle impact the levels and neutralizing capacity of antibodies induced against *S. aureus* immune evasion proteins. *Veterinary Research* 46 (1), 115.
- [142] E De Gregorio, E Caproni, JB Ulmer (2013) Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol* 4, 214.
- [143] D Christensen (2016) Vaccine adjuvants: Why and how. *Hum Vaccin Immunother* 12 (10), 2709–2711.
- [144] C Buonsanti, U D’Oro (2017) Chapter 5 - Discovery of Immune Potentiators as Vaccine Adjuvants, en: *Immunopotentiators in Modern Vaccines (Second Edition)*, (Eds.: VEJC Schijns, DT O’Hagan), Academic Press, pp. 85–104.
- [145] C Bode, G Zhao, F Steinhagen, T Kinjo, DM Klinman (2011) CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 10 (4), 499–511.
- [146] H Hemmi, O Takeuchi, T Kawai, T Kaisho, S Sato, H Sanjo, M Matsumoto, K Hoshino, H Wagner, K Takeda, S Akira (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408 (6813), 740–745.
- [147] DM Klinman, D Currie, I Gursel, D Verthelyi (2004) Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* 199 201–216.
- [148] M Gürsel, D Verthelyi, I Gürsel, KJ Ishii, DM Klinman (2002) Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J. Leukoc. Biol.* 71 (5), 813–820.
- [149] Y Krishnamachari, AK Salem (2009) Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (3), 205–217.
- [150] Y-C Song, H-Y Cheng, C-H Leng, S-K Chiang, C-W Lin, P Chong, M-H Huang, S-J Liu (2014) A novel emulsion-type adjuvant containing CpG oligodeoxynucleotides enhances CD8+ T-cell-mediated anti-tumor immunity. *J Control Release* 173 158–165.
- [151] N Hanagata (2012) Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine* 7 2181–2195.
- [152] T Haas, J Metzger, F Schmitz, A Heit, T Müller, E Latz, H Wagner (2008) The DNA sugar backbone 2’ deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 28 (3), 315–323.

- [153] WS Garrett, I Mellman (2001) CHAPTER 16 - Studies of endocytosis, en: *Dendritic Cells (Second Edition)*, (Eds.: MT Lotze, AW Thomson), Academic Press, pp. 213-229.
- [154] PJ Tacken, IJM de Vries, R Torensma, CG Figdor (2007) Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (10), 790–802.
- [155] Y Shimizu, H Takagi, T Nakayama, K Yamakami, T Tadakuma, N Yokoyama, N Kojima (2007) Intraperitoneal immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped soluble leishmanial antigen induces antigen-specific T-helper type immune response in BALB/c mice through uptake by peritoneal macrophages. *Parasite Immunol.* 29 (5), 229–239.
- [156] O Proudfoot, S Esparon, C-K Tang, K Laurie, I Barr, G Pietersz (2015) Mannan adjuvants intranasally administered inactivated influenza virus in mice rendering low doses inductive of strong serum IgG and IgA in the lung. *BMC Infect Dis* 15.
- [157] SP Vyas, AK Goyal, K Khatri (2010) Mannosylated liposomes for targeted vaccines delivery. *Methods Mol. Biol.* 605 177–188.
- [158] EJ McKenzie, PR Taylor, RJ Stillion, AD Lucas, J Harris, S Gordon, L Martinez-Pomares (2007) Mannose Receptor Expression and Function Define a New Population of Murine Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 178 (8), 4975–4983.
- [159] A Haddadi, S Hamdy, Z Ghotbi, J Samuel, A Lavasanifar (2014) Immunoadjuvant activity of the nanoparticles' surface modified with mannan. *Nanotechnology* 25 (35), 355101.
- [160] L Pinheiro, C Faustino (2017) Amino Acid-Based Surfactants for Biomedical Applications, en: *Application and Characterization of Surfactants*, (Ed.: R Najjar), IntechOpen.
- [161] M Zaman, I Toth (2013) Immunostimulation by synthetic lipopeptide-based vaccine candidates: structure-activity relationships. *Front Immunol* 9 (4), 318.
- [162] C Bombelli, L Giansanti, P Luciani, G Mancini (2009) Gemini surfactant based carriers in gene and drug delivery. *Curr Med Chem* 16 (2), 171–183.
- [163] LD Grippo (2018) Compuestos biocompatibles como carriers biológicos, Tesina de Licenciatura en Biotecnología. Directora: DM Müller; Co-directora: C Veaute, Universidad Nacional del Litoral, 2018.
- [164] P Johansen, TM Kündig (2013) Administration routes for the delivery of vaccines and immunotherapeutics, en: *Therapeutic Delivery Methods: A Concise Overview of Emerging Areas*, Future Science Ltd, pp. 146–157.
- [165] JS Lefebvre, L Haynes (2013) Vaccine strategies to enhance immune responses in the aged. *Curr Opin Immunol* 25 (4), 523–528.
- [166] K Ita (2016) Transdermal delivery of vaccines – Recent progress and critical issues. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 1080–1088.
- [167] S Namjoshi, H Benson (2011) Transdermal delivery of vaccines, en: *Novel Approaches to Vaccine Research*, (Ed.: KL Hefferon), Research Signpost, pp. 1–17.
- [168] WW Christie, X Han, Eds. (2012) *Lipid Analysis*. Fourth Edition Woodhead Publishing.
- [169] W Chan, P White (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- [170] M Pohin, C Veaute, J Garnier, C Barrault, L Cronier, V Huguier, L Favot, J Mcheik, F-X Bernard, J-C Lecron, F Morel, J-F Jégou (2018) Development of a new model of reconstituted mouse epidermis and characterization of its response to proinflammatory cytokines. *J Tissue Eng Regen Med* 12 (2), e1098–e1107.
- [171] V Huguier, J-P Giot, M Simonneau, P Levillain, S Charreau, M Garcia, J-F Jégou, C Bodet, F Morel, J-C Lecron, L Favot (2019) Oncostatin M exerts a protective effect against excessive scarring by counteracting the inductive effect of TGFβ1 on fibrosis markers. *Scientific Reports* 9 (1), 2113.
- [172] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. National Academies Press (US).
- [173] S Weisman, D Hirsch-Lerner, Y Barenholz, Y Talmon (2004) Nanostructure of Cationic Lipid-Oligonucleotide Complexes. *Biophys J* 87 (1), 609–614.

- [174] I Badea, S Babiuk, L Babiuk, M Foldvari (2010) *Gemini* nanoparticles as a co-delivery system for antigen-CpG oligodeoxynucleotide adjuvant combination. *IJBNN* 1 (2/3/4), 290–307.
- [175] SP Vyas, K Khatri, AK Goyal (2009) Functionalized nanocarrier(s) to image and target fungi infected immune cells. *Med Mycol* 47 (Supplement_1), S362–S368.
- [176] C Lai, S Duan, F Ye, X Hou, X Li, J Zhao, X Yu, Z Hu, Z Tang, F Mo, X Yang, X Lu (2018) The enhanced antitumor-specific immune response with mannose- and CpG-ODN-coated liposomes delivering TRP2 peptide. *Theranostics* 8 (6), 1723–1739.
- [177] J Stetefeld, SA McKenna, TR Patel (2016) Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8 (4), 409–427.
- [178] F Bordi, C Cametti, S Sennato (2006) Chapter 9: Electrical Properties of Aqueous Liposome Suspensions, en: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, (Ed.: AL Liu), Academic Press, pp. 281–320.
- [179] M Pons, M Foradada, J Estelrich (1993) Liposomes obtained by the ethanol injection method. *International Journal of Pharmaceutics* 95 (1), 51–56.
- [180] MK Schunk, GE Macallum (2005) Applications and Optimization of Immunization Procedures. *ILAR J* 46 (3), 241–257.
- [181] RA Strikas, AC Mawle, LK Pickering, WA Orenstein (2018) 6 - Active Immunization, en: *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*, (Eds.: SS Long, CG Prober, M Fischer), Elsevier, pp. 43-71.e4.
- [182] J Yano, PL Fidel, Jr. (2011) Protocols for Vaginal Inoculation and Sample Collection in the Experimental Mouse Model of *Candida vaginitis*. *J Vis Exp* (58), 3382.
- [183] K Schaefer, N Brown, PM Kaye, CJ Lacey (2014) Cervico-Vaginal Immunoglobulin G Levels Increase Post-Ovulation Independently of Neutrophils. *PLOS ONE* 9 (12), e114824.
- [184] EL Parr, MB Parr (1997) Immunoglobulin G is the main protective antibody in mouse vaginal secretions after vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type 2. *J Virol* 71 (11), 8109–8115.
- [185] Z Li, S Palaniyandi, R Zeng, W Tuo, DC Roopenian, X Zhu (2011) Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (11), 4388–4393.
- [186] PV Nguyen, JK Kafka, VH Ferreira, K Roth, C Kaushic (2014) Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. *Cell Mol Immunol* 11 (5), 410–427.
- [187] E Bardel, R Doucet-Ladeveze, C Mathieu, AM Harandi, B Dubois, D Kaiserlian (2016) Intradermal immunisation using the TLR3-ligand Poly (I:C) as adjuvant induces mucosal antibody responses and protects against genital HSV-2 infection. *NPJ Vaccines* 1(16010) 1–10.
- [188] RC Russi (2019) Estudio de la respuesta inmune frente a infecciones genitales y su relación con infertilidad. Contribución al diseño de estrategias inmunoproliféricas contra *Chlamydia trachomatis*, Tesis de Doctorado. Directora: C Veaute, Universidad Nacional del Litoral.
- [189] F Zhang, O Ledue, M Jun, C Goulart, R Malley, Y-J Lu (2018) Protection against *Staphylococcus aureus* Colonization and Infection by B- and T-Cell-Mediated Mechanisms. *MBio* 9 (5), e01949-18.
- [190] VG Fowler, RA Proctor (2014) Where Does a *Staphylococcus aureus* Vaccine Stand? *Clin Microbiol Infect* 20 (0 5), 66–75.
- [191] M-C Gaudreau, P Lacasse, BG Talbot (2007) Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 25 (5), 814–824.
- [192] P Bhat, G Leggatt, N Waterhouse, IH Frazer (2017) Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis* 8 (6), e2836–e2836.
- [193] Y Yang, Q Zhu, W Sun, J Guo, X Ning, Q Li, Y Guo, J Li, Z Kou, Y Zhou (2017) A recombinant multi-epitope protein MEP1 elicits efficient long-term immune responses against HIV-1 infection. *Hum Vaccin Immunother* 13 (6), 1466–1474.

- [194] P Chiarella, B Edelmann, VM Fazio, AM Sawyer, A de Marco (2010) Antigenic features of protein carriers commonly used in immunisation trials. *Biotechnol. Lett.* 32 (9), 1215–1221.
- [195] C Infante-Duarte, T Kamradt (1997) Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in alphabeta T-cell receptor transgenic mice. *Infect. Immun.* 65 (10), 4094–4099.
- [196] C Infante-Duarte, HF Horton, MC Byrne, T Kamradt (2000) Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells. *The Journal of Immunology* 165 (11), 6107–6115.
- [197] AG Kutikhin (2012) Pattern Recognition Receptors and Cancer: Is There Any Role of Inherited Variation?, en: *Recent Advances in Immunology to Target Cancer, Inflammation and Infections*, (Ed.: JR Kanwar), InTech, pp. 83–100.
- [198] AP Moreira, KA Cavassani, UB Ismailoglu, R Hullinger, MP Dunleavy, DA Knight, SL Kunkel, S Uematsu, S Akira, CM Hogaboam (2011) The protective role of TLR6 in a mouse model of asthma is mediated by IL-23 and IL-17A. *J Clin Invest* 121 (11), 4420–4432.
- [199] ME Morgan, PJ Koelink, B Zheng, MHMGM den Brok, HJG van de Kant, HW Verspaget, G Folkerts, GJ Adema, AD Kraneveld (2014) Toll-like receptor 6 stimulation promotes T-helper 1 and 17 responses in gastrointestinal-associated lymphoid tissue and modulates murine experimental colitis. *Mucosal Immunol* 7 (5), 1266–1277.
- [200] G Bozzuto, A Molinari (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* 10, 975–999.
- [201] W Lu, L Qiu, Z Yan, Z Lin, M Cao, C Hu, Z Wang, J Wang, Y Yu, X Cheng, P Cao, R Li (2015) Cytotoxic T cell responses are enhanced by antigen design involving the presentation of MUC1 peptide on cholera toxin B subunit. *Oncotarget* 6 (33), 34537–34548.
- [202] N Kojima, M Ishii, Y Kawauchi, H Takagi (2013) Oligomannose-coated liposome as a novel adjuvant for the induction of cellular immune responses to control disease status. *Biomed Res Int* 2013 562924.
- [203] S Jain, SP Vyas (2005) Mannosylated niosomes as carrier adjuvant system for topical immunization. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57 (9), 1177–1184.
- [204] K Richard, SK Pierce, W Song (2008) The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. *J Immunol* 181 (3), 1746–1752.
- [205] Z-Q Liu, P-C Yang (2012) Construction of pET-32 α (+) Vector for Protein Expression and Purification. *N Am J Med Sci* 4 (12), 651–655.
- [206] A García, A Mannion, Y Feng, CM Madden, V Bakthavatchalu, Z Shen, Z Ge, JG Fox (2016) Cytotoxic Escherichia coli strains encoding colibactin colonize 1 laboratory mice. *Microbes Infect* 18 (12), 777–786.
- [207] S Hamdy, A Haddadi, A Shayeganpour, J Samuel, A Lavasanifar (2011) Activation of antigen-specific T cell-responses by mannan-decorated PLGA nanoparticles. *Pharm. Res.* 28 (9), 2288–2301.
- [208] DD Kish, X Li, RL Fairchild (2009) CD8 T cells producing IL-17 and IFN- γ initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *J Immunol* 182 (10), 5949–5959.
- [209] JS Cho, EM Pietras, NC Garcia, RI Ramos, DM Farzam, HR Monroe, JE Magorien, A Blauvelt, JK Kolls, AL Cheung, G Cheng, RL Modlin, LS Miller (2010) IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest* 120 (5), 1762–1773.
- [210] H Hamada, M de la L Garcia-Hernandez, JB Reome, SK Misra, TM Strutt, KK McKinstry, AM Cooper, SL Swain, RW Dutton (2009) Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J. Immunol.* 182 (6), 3469–3481.
- [211] N Yeh, NL Glosson, N Wang, L Guindon, C McKinley, H Hamada, Q Li, RW Dutton, P Shrikant, B Zhou, RR Brutkiewicz, JS Blum, MH Kaplan (2010) Tc17 cells are capable

- of mediating immunity to vaccinia virus by acquisition of a cytotoxic phenotype. *J Immunol* 185 (4), 2089–2098.
- [212] C Volpi, F Fallarino, MT Pallotta, R Bianchi, C Vacca, ML Belladonna, C Orabona, AD Luca, L Boon, L Romani, U Grohmann, P Puccetti (2013) High doses of CpG oligodeoxynucleotides stimulate a tolerogenic TLR9–TRIF pathway. *Nat Commun* 4 (1), 1–11.
- [213] L Huang, HP Lemos, L Li, M Li, PR Chandler, B Baban, TL McGaha, B Ravishankar, JR Lee, DH Munn, AL Mellor (2012) Engineering DNA nanoparticles as immunomodulatory reagents that activate regulatory T cells. *J Immunol* 188 (10), 4913–4920.
- [214] GV Trunova, OV Makarova, ME Diatropov, IM Bogdanova, LP Mikchailova, SO Abdulaeva (2011) Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57BL/6 mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 151 (1), 99–102.
- [215] N Petrovsky (2015) Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs. *Drug Saf* 38 (11), 1059–1074.
- [216] EMEA (2005) Guideline on adjuvants in vaccines for human use. EMEA/CHMP/VEG/134716/2004.
- [217] LD Grippo, IG Reidel, MI García, A Streu, DM Müller, CM Veaute (2020) Gemini lipopeptides as vaccine adjuvants: a new role for these versatile carriers. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 9 (2), 159–163.
- [218] M Bouton (2016) Chapter 29 - Vaccines, en: *Ciottone's Disaster Medicine (Second Edition)*, (Ed.: GR Ciottone), Elsevier, pp. 178–184.
- [219] JK Hickling, KR Jones, M Friede, D Zehring, D Chen, D Kristensen (2011) Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. *Bull. World Health Organ.* 89 (3), 221–226.
- [220] MMA Elsayed, OY Abdallah, VF Naggar, NM Khalafallah (2007) Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics* 332 (1), 1–16.
- [221] QD Pham, S Björklund, J Engblom, D Topgaard, E Sparr (2016) Chemical penetration enhancers in stratum corneum — Relation between molecular effects and barrier function. *Journal of Controlled Release* 232, 175–187.
- [222] RS Teixeira, TFGG Cova, SMC Silva, R Oliveira, MLC do Vale, EF Marques, AACC Pais, FJB Veiga (2015) Novel serine-based *gemini* surfactants as chemical permeation enhancers of local anesthetics: A comprehensive study on structure–activity relationships, molecular dynamics and dermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 93, 205–213.
- [223] R Muzzalupo, L Pérez, A Pinazo, L Tavano (2017) Pharmaceutical versatility of cationic niosomes derived from amino acid-based surfactants: Skin penetration behavior and controlled drug release. *Int J Pharm* 529 (1–2), 245–252.
- [224] T Alama, K Kusamori, M Morishita, H Katsumi, T Sakane, A Yamamoto (2019) Mechanistic Studies on the Absorption-Enhancing Effects of Gemini Surfactant on the Intestinal Absorption of Poorly Absorbed Hydrophilic Drugs in Rats. *Pharmaceutics* 11 (4), 170.
- [225] DD Verma, S Verma, G Blume, A Fahr (2003) Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int J Pharm* 258 (1–2), 141–151.
- [226] S Ternullo, L de Weerd, AM Holsæter, GE Flaten, N Škalko-Basnet (2017) Going skin deep: A direct comparison of penetration potential of lipid-based nanovesicles on the isolated perfused human skin flap model. *Eur J Pharm Biopharm* 121, 14–23.
- [227] KV Sawant, KM Poluri, AK Dutta, KM Sepuru, A Troshkina, RP Garofalo, K Rajarathnam (2016) Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep* 6, 33123.
- [228] T Girbl, T Lenn, L Perez, L Rolas, A Barkaway, A Thiriot, C Del Fresno, E Lynam, E Hub, M Thelen, G Graham, R Alon, D Sancho, UH von Andrian, M-B Voisin, A Rot, S Nourshargh (2018) Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and

- CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis. *Immunity* 49 (6), 1062-1076.e6.
- [229] KF Nolan, V Strong, D Soler, PJ Fairchild, SP Cobbold, R Croxton, J-A Gonzalo, A Rubio, M Wells, H Waldmann (2004) IL-10-Conditioned Dendritic Cells, Decommissioned for Recruitment of Adaptive Immunity, Elicit Innate Inflammatory Gene Products in Response to Danger Signals. *The Journal of Immunology* 172 (4), 2201–2209.
- [230] PT Kuo, Z Zeng, N Salim, S Mattarollo, JW Wells, GR Leggatt (2018) The Role of CXCR3 and Its Chemokine Ligands in Skin Disease and Cancer. *Front Med (Lausanne)* 5, 271.
- [231] SL Deshmane, S Kremlev, S Amini, BE Sawaya (2009) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res* 29 (6), 313–326.
- [232] MJ Trifilo, CC Bergmann, WA Kuziel, TE Lane (2003) CC Chemokine Ligand 3 (CCL3) Regulates CD8+ T-Cell Effector Function and Migration following Viral Infection. *J Virol* 77 (7), 4004–4014.
- [233] J Reibman, B Bleck, D Tse, MC de Lafaille (2011) 8 - Diesel exhaust particles and the airway epithelial cell–dendritic cell interface in the control of immune homeostasis, en: *Allergens and Respiratory Pollutants*, (Ed.: MA Williams), Woodhead Publishing, pp. 171–200.
- [234] M Yu, J Hu, M-X Zhu, T Zhao, W Liang, S Wen, H-H Li, Q Long, M Wang, H-P Guo, X Cheng, Y-H Liao, J Yuan (2013) Cardiac fibroblasts recruit Th17 cells infiltration into myocardium by secreting CCL20 in CVB3-induced acute viral myocarditis. *Cell. Physiol. Biochem.* 32 (5), 1437–1450.
- [235] C Idan, R Peleg, V Elena, T Martin, T Cicerone, W Mareike, B Lydia, F Marina, M Gerhard, F-M Elisa, CA Dinarello, AN Ron, S Robert (2015) IL-1 α is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Sci Rep* 5, 14756.
- [236] G Kaplanski, V Marin, F Montero-Julian, A Mantovani, C Farnarier (2003) IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in Immunology* 24 (1), 25–29.
- [237] MC Kostek, K Nagaraju, E Pistilli, A Sali, S-H Lai, B Gordon, Y-W Chen (2012) IL-6 signaling blockade increases inflammation but does not affect muscle function in the mdx mouse. *BMC Musculoskeletal Disorders* 13 (1), 106.
- [238] N Parameswaran, S Patial (2010) Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20 (2), 87–103.
- [239] VL Ferreira, HHL Borba, A de F Bonetti, L P Leonard, R Pontarolo (2019) Cytokines and Interferons: Types and Functions, en: *Autoantibodies and Cytokines*, (Ed.: K Khalid), IntechOpen, pp. 65-87.
- [240] RC Hespanhol, M de Nazaré C Soeiro, MB Meuser, M de Nazareth S L Meirelles, S Côte-Real (2005) The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J. Histochem. Cytochem.* 53 (1), 35–44.
- [241] Y Yamamoto, H Friedman (2005) Effect of Alcohol on Microbial Infection, en: *Infectious Diseases and Substance Abuse*, (Eds.: H Friedman, TW Klein, M Bendinelli), Springer US, pp. 159–169.
- [242] L Martinez-Pomares (2012) The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 92 (6), 1177–1186.
- [243] P Proost, S Verpoest, K Van de Borne, E Schutyser, S Struyf, W Put, I Ronsse, B Grillet, G Opdenakker, J Van Damme (2004) Synergistic induction of CXCL9 and CXCL11 by Toll-like receptor ligands and interferon-gamma in fibroblasts correlates with elevated levels of CXCR3 ligands in septic arthritis synovial fluids. *J. Leukoc. Biol.* 75 (5), 777–784.
- [244] MR Neeland, MJ Elhay, DR Powell, FJ Rossello, ENT Meeusen, MJ de Veer (2015) Transcriptional profile in afferent lymph cells following vaccination with liposomes incorporating CpG. *Immunology* 144 (3), 518–529.

- [245] S Jang, J-S Park, Y-H Won, S-J Yun, S-J Kim (2012) The Expression of Toll-Like Receptors (TLRs) in Cultured Human Skin Fibroblast is Modulated by Histamine. *Chonnam Med J* 48 (1), 7–14.
- [246] LS Miller, OE Sørensen, PT Liu, HR Jalian, D Eshtiaghpour, BE Behmanesh, W Chung, TD Starner, J Kim, PA Sieling, T Ganz, RL Modlin (2005) TGF- α regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J. Immunol.* 174 (10), 6137–6143.
- [247] K Sugita, K Kabashima, K Atarashi, T Shimauchi, M Kobayashi, Y Tokura (2007) Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol* 147 (1), 176–183.
- [248] J Zeng, X Chen, K Lei, D Wang, L Lin, Y Wang, Y Li, Y Liu, L Zhang, D Zuo, L Sun (2019) Mannan-binding lectin promotes keratinocyte to produce CXCL1 and enhances neutrophil infiltration at the early stages of psoriasis. *Exp. Dermatol.* 28 (9), 1017–1024.