

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

“Desarrollo de inmunógenos para el control de mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*”

Lic. Joaquín Cicotello

Directora de Tesis: Dra. Cecilia M. Camussone

Co-directora de Tesis: Dra. Carolina M. I. Veaute

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (CONICET - INTA)

Laboratorio de Inmunología Experimental - FBCB - UNL

-2026-

AGRADECIMIENTOS

A la universidad pública, gratuita y de calidad. A la Universidad Nacional de Litoral, con la cual llevo una conexión desde mis comienzos en la Escuela industrial.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) por todo el camino recorrido en estos años en ambas carreras. Que fortuna.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por haberme otorgado las becas que permitieron formarme como Doctor. Un privilegio.

A mi directora Dra. Cecilia Camussone por bríndame la oportunidad de hacer un doctorado, por su sinceridad, compromiso y transparencia desde el minuto cero. Gracias por todas las enseñanzas y el tiempo dedicado. Fue muy ameno, un placer.

A mi co-directora, Dra. Carolina Veaute, por su constante predisposición y por estar siempre atenta en cada etapa de este proceso.

Al Dr. Luis Calvino por su participación sincera e interesada durante todo este recorrido. Gracias por compartir conmigo conocimientos tan valiosos.

A mi familia, mis hermanas, Luci, Jose, gracias por estar siempre. A mi abuela, Chela, que con sus 96 años todavía me sigue de cerca en mis estudios e incentiva en continuar.

A mi vieja, Norita, gracias, simplemente gracias por acompañarme en todo lo que me propongo. Gracias por todo el apoyo que me das.

A mi viejo Cachi, quien me enseñó este camino del aprendizaje. Seguramente estaría muy orgulloso.

A mis amigos, siempre un apoyo incondicional.

A mi flaca, mi compañera, gracias por acompañarme en este camino y en la vida.

A mis compañeros y amigos de Sanidad Animal del Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA-CONICET) gracias por todos los momentos compartidos. Gracias Cacho, Guille, Gustavo, por todo el trabajo de campo y tiempo dedicado con los animales, gracias por su participación y enseñanza.

A mis compañeras del Laboratorio de Inmunología Experimental (FBCB - UNL) por todo su aporte en este tiempo.

A Sol Renna y Florencia Olmos del ICiVet-LITORAL (UNL - CONICET) por su generosa predisposición, diseño y colaboración con todo el trabajo de citometría de flujo.

Al Dr. Alvaro Siano y Verónica Húmpola del Laboratorio de Péptidos Bioactivos (Dpto. Química Orgánica, FBCB - UNL) por su aporte para este trabajo.

A Dra. Laura Gutiérrez de la Facultad de Ingeniería Química por dejar a disposición el equipo para la realización de la técnica de DLS.

APORTES CIENTIFICOS Y TECNOLÓGICOS

1. Camussone, C. M., Reidel, I. G., Molineri, A. I., Cicotello, J., Miotti, C., Archilla, G. S., Suárez Archilla, G., Veaute, C., Pujato, N., & Calvino, L. F. (2022). Efficacy of immunization with a recombinant *S. aureus* vaccine formulated with liposomes and ODN-CpG against natural *S. aureus* intramammary infections in heifers and cows. *Research in Veterinary Science*, 145, 177-187. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.014>.
2. Cicotello, J., Ramezanigardaloud, N., Miotti, C., Molineri, A. I., Grunert, T., Archilla, G. S., Signorini, M. L., Calvino, L. F., & Camussone, C. M. (2024). Heifers introduced a new subtype into a herd with persistent *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Journal of Dairy Research*, 91(4), 420-426. <https://doi.org/10.1017/S0022029925000202>.

ÍNDICE

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	1
<i>APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS</i>	3
<i>ÍNDICE</i>	4
<i>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</i>	7
<i>RESUMEN</i>	10
<i>ABSTRACT</i>	13
<i>INTRODUCCIÓN GENERAL</i>	16
Mastitis bovina	16
Mastitis bovina por <i>S. aureus</i> , mecanismos de acción y evasión	18
Vacunas para IIM causadas por <i>S. aureus</i>	24
Estrategias alternativas frente a <i>S. aureus</i>	26
<i>OBJETIVOS</i>	28
<i>CAPÍTULO 1</i>	29
INTRODUCCIÓN	30
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Optimización de los antígenos recombinantes	41
1.1. Obtención de las secuencias codificantes	41
1.2. Clonado molecular	42
1.2.1. Cepas y vectores plasmídicos	42
1.2.2. Clonado	43
1.2.3. Transformación bacteriana (método MOPS/CaCl ₂)	44
1.3. Obtención de los antígenos recombinantes	45
1.3.1. Estandarización de expresión de los antígenos recombinantes	45
1.3.2. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes	46
1.3.3. Purificación de proteínas recombinantes	47
1.3.4. Evaluación de actividad hemolítica de las toxinas recombinantes e inactivación	47
2. Obtención de formulaciones adyuvantes	48
2.1. Preparación de liposomas e inmunoestimulantes	48
2.2. Formulación y caracterización de inmunógenos	48
3. Caracterización de la respuesta inmune inducida por las formulaciones	49
3.1. Animales y esquema de inmunización	49
3.2. Evaluación de la respuesta inmune	50

3.2.1. Respuesta humoral.....	50
3.2.2. Respuesta celular	50
4. Análisis estadístico.....	51
5. Consideraciones éticas	51
RESULTADOS	52
1. Obtención de antígenos recombinantes.....	52
1.1. Clonado molecular	52
1.2. Expresión de recombinantes	52
1.3. Actividad hemolítica de las toxinas recombinantes (rAt y rBt)	54
2. Caracterización de formulaciones	55
3. Evaluación de la Respuesta inmune	56
3.1. Respuesta inmune humoral	56
3.1.1. Detección de IgG específicas frente a antígenos recombinantes en suero....	56
3.1.2. Títulos de IgG específicos	61
3.1.3. Cuantificación de anticuerpos IgG1 e IgG2 específicos frente a antígenos recombinantes	62
3.2. Respuesta inmune celular.....	64
3.2.1. Producción de citoquinas	64
DISCUSIÓN	67
CAPÍTULO 2.....	74
INTRODUCCIÓN	75
OBJETIVOS	90
MATERIALES Y MÉTODOS	91
1. Ensayo piloto para la selección de la cepa de Staphylococcus aureus	91
1.1. Cepas de Staphylococcus aureus.....	91
1.2. Ensayo piloto de infección experimental.	92
2. Ensayo de inmunización e Infección experimental	92
2.1. Animales e Inmunización refuerzo al parto	92
2.2. Selección de animales para desafío experimental.	92
2.3. Desafío intramamario experimental	93
2.4. Técnica de infusión intramamaria.....	94
2.5. Procedimientos de muestreos	94
2.6. Evaluación del progreso de la infección y capacidad de protección	95
2.7. Examen bacteriológico.....	95
2.8. Caracterización genotípica (PFGE).....	96
2.9. Recuento de células somáticas en leche.....	96
2.10. Tratamiento final de animales infectados.....	96
3. Evaluación de la respuesta inmune	97

3.1.	Respuesta humoral	97
3.1.1.	Niveles de IgG específicas a los antígenos vacunales	97
3.1.2.	Niveles de IgG específica para la cepa S. aureus 26L	97
3.2.	Respuesta celular.....	98
3.2.1.	ELISA para detección de citoquinas en leche.....	98
3.2.2.	Análisis poblacional de células somáticas en leche	98
4.	Tratamiento estadístico.....	101
5.	Consideraciones éticas	101
RESULTADOS		102
1.	Respuesta inmune a la inmunización preparto.....	102
1.1.	Niveles de IgG específica contra antígenos recombinantes en suero.....	102
1.2.	Niveles de IgG1 e IgG2 específica contra antígenos recombinantes en suero.....	104
2.	Selección de una cepa de S. aureus para el modelo de infección intramamaria subclínica.....	105
3.	Desafío experimental.....	105
3.1.	Monitoreo de la infección	105
3.2.	Examen bacteriológico y tasa de infección	106
3.3.	Recuento de células somáticas (RCS).....	109
4.	Evaluación de la respuesta inmune post desafío.	110
4.1.	Respuesta humoral en leche.	110
4.1.1.	Respuesta de IgG específica contra antígenos recombinantes.....	110
4.1.2.	Evaluación de subclases de IgG específica recombinantes.	112
4.1.3.	Niveles de IgG específica contra el lisado de S. aureus 26L	113
4.2.	Respuesta inmune celular en leche	114
4.2.1.	Evaluación de citoquinas	114
4.2.2.	Caracterización de poblaciones celulares en leche.	115
DISCUSIÓN		119
CONCLUSIÓN GENERAL		136
BIBLIOGRAFÍA		138
ANEXO I – Soluciones y medios de cultivo.....		156
ANEXO II – Análisis PFGE		158
ANEXO III: Optimización de la expresión de rFnbpA de S. aureus		159

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG2C16	Lipopéptido AG2C16
Agr	<i>Accessory gene regulator</i>
AIP	Péptido autoinductor
AM	Antimicrobianos
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
Bap	<i>Biofilm associated protein</i>
C1	Control sin inmunizar
C2	Lip+CpG-ODN+AG2C16
C3	Lip+Man
CDs	Células dendríticas
CD	Cuartos desafiados
CLR	Receptores de lectina tipo C
CP	Polisacárido capsular
CPA	Células presentadoras de antígenos
CpG-ODN	Oligodesoxinucleótido con motivos CpG
D	Diámetro hidrodinámico
DLL	<i>Dock, lock and latch</i>
DLS	Dynamic Light Scattering
DO	Densidad óptica
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fb	Fibrinógeno
Fn	Fibronectina
FnBRs	Repeticiones en tándem de unión a fibronectina
G1	Lip+CpG-ODN+Rec
G2	Lip+AG2-C16+Rec
G3	Lip+CpG-ODN+AG2-C16+Rec
G4	Lip+Man+Rec
GM	Glándula mamaria
GR	Glóbulos rojos
Hla	Hemolisina A
Hlb	Hemolisina B
Hlg	Hemolisina gamma
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IIM	Infecciones intramamarias
IL	Interleuquina
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPD	Índice de polidispersidad
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IS	Inmunoestimulantes
Isd	Proteína de superficie reguladora de hierro

LB	Caldo Luria-Bertani
Lip	Liposomas
LT	Linfocitos T
LukAB	Leucocidina AB
LukED	Leucocidina ED
LukMF'	Leucocidina MF'
LUV	Vesículas unilaminares grandes
mAbs	Anticuerpos monoclonales
MAC	Complejo de ataque a la membrana
Man	Mananos
ME	Matriz extracelular
MEC	Células epiteliales mamarias
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLV	Vesículas multilaminares
MR	Recepto de manosa
MSCRAMMs	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Receptores tipo NOD
ON	<i>Over night</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer fosfato salino
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
PEG	Polietilenglicol
Pi	Post infusión
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PO	Enlaces fosfodiéster
PS	Enlaces fosforotioato
PVL	Leucocidina Panton-Valentine
PWM	Mitógeno de pokeweed
RAM	Resistencia a antimicrobianos
rAT	Hemolisina A recombinante
rBt	Hemolisina B recombinante
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	Receptores tipo RIG-I
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
SAA	Surfactantes aminoácidos
Sbi	<i>Staphylococcal binder of immunoglobulin</i>
SCV	Variante colonia pequeña
Sdr	Proteínas con repeticiones serina-aspartato
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNA	<i>Staphylococcus no aureus</i>
SOC	Medio de Optimización de Supervivencia con Catabolito
SpA	Proteína A de superficie

ST	Solución transformadora
SUV	Vesículas unilaminares pequeñas
Tc	Linfocitos T citotóxicos
Th	<i>T helper</i>
TLR	Receptores tipo Toll
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
TRX	Tiorredoxina
UFC	Unidades formadoras de colonias
ULV	Vesículas unilaminares
WBA	<i>Whole Blood Assay</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido.

RESUMEN

La mastitis bovina constituye una de las enfermedades de mayor relevancia económica y sanitaria para la industria láctea a nivel mundial, debido a su impacto negativo sobre la producción, la calidad de la leche y el bienestar animal. El control de la enfermedad se ha fundamentado tradicionalmente en dos pilares estratégicos, la prevención a través de prácticas de higiene y desinfección durante el proceso de ordeño para reducir la exposición y transmisión entre animales y por otro, la implementación de terapias antibióticas, orientadas a eliminar o acortar la duración de la enfermedad una vez detectada la infección, ya sea en casos clínicos durante la lactancia o subclínicos al inicio del período seco. *Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones intramamarias (IIM), caracterizándose por su elevada cronicidad y por las limitadas tasas de curación luego del tratamiento antimicrobiano. El éxito patogénico de este microorganismo se vincula con un complejo arsenal de factores de virulencia, coordinados por un sistema de *quorum sensing*, que le permite transitar desde una fase inicial de colonización adhesiva hacia estadios invasivos y citotóxicos. En este contexto, el desarrollo de estrategias preventivas basadas en la inmunización se ha vuelto prioritario. Sin embargo, el diseño de vacunas eficaces contra *S. aureus* continúa siendo un desafío, particularmente debido a la complejidad del patógeno, la dificultad de modular la respuesta inmune en la glándula mamaria y la necesidad de desarrollar sistemas adyuvantes capaces de inducir perfiles inmunológicos adecuados. Las vacunas comerciales disponibles actualmente muestran una eficacia limitada e inconsistente en la prevención de nuevas IIMs. En este marco, la presente tesis doctoral aborda el desarrollo y la evaluación de inmunógenos prototípicos basados en una plataforma de vacunas a subunidades, integrando moléculas recombinantes de factores de virulencia clave del microorganismo, con sistemas adyuvantes liposomales de última generación.

Como antígenos vacunales se seleccionaron cuatro proteínas esenciales para la patogénesis estafilocócica: las adhesinas ClfA y FnbpA, involucradas en la colonización tisular y la formación de biopelículas, y las toxinas α y β , responsables del daño tisular y de la evasión inmunitaria. Un aporte relevante de este trabajo fue la optimización de la expresión de estos antígenos recombinantes en *E. coli* sin el uso de proteínas de fusión, con el objetivo de preservar la conformación nativa de los epítopes y evitar respuestas inmunes inespecíficas. Las estrategias permitieron la obtención de los antígenos de forma soluble y con buenos rendimientos. En paralelo, se desarrollaron formulaciones adyuvantes de nueva generación basadas en liposomas catiónicos, suplementados con distintos inmunoestimulantes (IS) como oligodeoxinucleótidos con motivos CpG específicos para bovinos (CpG-ODN), el lipopéptido sintético tipo Gemini

AG2C16 y mananos derivados de *Saccharomyces cerevisiae*. La caracterización biofísica mediante dispersión dinámica de luz (DLS) reveló que la incorporación de los diversos inmunostimulantes modifica las propiedades de las partículas lipídicas. La inclusión de AG2C16 ejerce un efecto estabilizador sobre la suspensión coloidal al contrarrestar la agregación inducida por el CpG-ODN. Del mismo modo, la incorporación de mananos preservó la estabilidad de la mezcla. En ambos casos, se logró una distribución homogénea, condición óptima para favorecer la captura por parte de las células presentadoras de antígenos.

En el primer capítulo se aborda la caracterización de la respuesta inmune inducida por las formulaciones vacunales, en modelo bovino. La evaluación inmunológica se llevó a cabo en un ensayo con vaquillonas Holstein de entre 8 y 10 meses de edad, donde los animales fueron asignados aleatoriamente a siete grupos experimentales que involucran grupos controles e inmunizados con la mezcla de antígenos recombinantes formulados con distintas combinaciones adyuvantes, ya sea AG2C16, CpG-ODN, mananos o la combinación de CpG-ODN+AG2C16. El protocolo de inmunización consistió en un esquema inicial de dos dosis aplicadas con un intervalo de 21 días, seguido de un refuerzo a los ocho meses. Los resultados demostraron que las formulaciones liposomales inducen una respuesta inmune robusta y sostenida, tanto humoral como celular, con un perfil predominantemente evidenciado por una producción significativa de IFN- γ , junto con una contribución parcial de respuestas de tipo Th17 (IL-17), consideradas relevantes para el control de patógenos con capacidad de persistencia intracelular. A su vez la aplicación de la dosis de refuerzo logró elevar rápidamente los niveles de anticuerpos IgG a valores similares a los alcanzados en el esquema inicial y sostenida por hasta 30 días, evidenciando su capacidad para inducir memoria inmunológica robusta y sostenida. Se seleccionaron Sobre la base de este desempeño, se seleccionaron las formulaciones Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec (G3) y Lip+Man+Rec (G4), identificadas como las más promisorias por su capacidad para activar un perfil inmunológico equilibrado, con el fin de continuar con la evaluación de su capacidad protectora.

El segundo capítulo de la tesis se orientó a evaluar la eficacia protectora de las formulaciones seleccionadas mediante un modelo experimental de desafío intramamario controlado. En esta etapa, se trabajó específicamente con los animales pertenecientes a los grupos que mostraron el mejor desempeño inmunológico previo: los grupos inmunizados G3 (Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec) y G4 (Lip+Man+Rec), junto con el grupo control sin tratamiento (C1). Estos animales recibieron una dosis de vacuna refuerzo al parto (30 días antes de la fecha probable de parto), y se desafiaron de forma intramamaria con una cepa de campo de *S. aureus*, 30 días luego del parto. La aplicación del refuerzo estimuló significativamente los niveles séricos de IgG, IgG1 e IgG2 para los antígenos rAt, rBt y rClfA en ambos grupos inmunizados, logrando restablecer títulos similares a los del esquema inicial. Al momento del desafío (60 días post-

refuerzo), la vacunación preparto generó en leche niveles aumentados de IgG específicas en todos los grupos experimentales, respuesta caracterizada por la presencia de IgG1 específica frente todos los antígenos para Lip+Man+Rec y frente a rAt, rBt y rClfA para Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y una limitada contribución de IgG2. Si bien la vacunación al preparto promovió una sensibilización inmunológica de la glándula mamaria, evidenciada por los niveles de anticuerpos específicos y por un reclutamiento temprano e intenso de granulocitos CH138A⁺, no logró prevenir la colonización inicial ni reducir de manera consistente la persistencia bacteriológica. Este fenómeno podría estar asociado a un desacople efector, caracterizado por una disponibilidad limitada de IgG2 opsonizante en leche y una atenuación de la respuesta inflamatoria local, atribuible a mecanismos de evasión desplegados por la cepa de *S. aureus* utilizada para el desafío.

En conjunto, esta tesis demuestra que las plataformas vacunales basadas en subunidades antigénicas y adyuvantes liposomales permiten inducir respuestas inmunes sistémicas robustas en bovinos, aunque la protección frente a *S. aureus* requiere superar las particularidades inmunológicas de la glándula mamaria. Los resultados obtenidos aportan información relevante para el diseño racional de nuevas estrategias vacunales y sugieren que enfoques combinados, orientados a potenciar la inmunidad local, serán claves para el control efectivo de la mastitis bovina.

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the most economically and health-relevant diseases for the dairy industry worldwide, due to its negative impact on production, milk quality, and animal welfare. Mastitis control has traditionally been based on two main strategies: prevention through hygiene and disinfection practices during the milking process to reduce exposure and transmission between animals, and antibiotic therapies aimed at eliminating or shortening the duration of the disease once infection is detected, either in clinical cases during lactation or subclinical cases at the beginning of the dry period. *Staphylococcus aureus* is one of the main etiological agents of intramammary infections (IMI), characterized by its high chronicity and limited cure rates following antimicrobial treatment. The pathogenic success of this microorganism is linked to a complex arsenal of virulence factors, coordinated by a quorum sensing system, which allows it to transition from an initial phase of adhesive colonization to invasive and cytotoxic stages. In this context, the development of preventive strategies based on immunization has become a priority. However, the design of effective vaccines against *S. aureus* remains a challenge, particularly due to the complexity of the pathogen, the difficulty of modulating the immune response in the mammary gland, and the need to develop adjuvant systems capable of inducing appropriate immunological profiles. Currently available commercial vaccines show limited and inconsistent efficacy in preventing new IMIs. In this context, this doctoral thesis addresses the development and evaluation of prototype immunogens based on a subunit vaccine platform, integrating recombinant molecules of key virulence factors of the microorganism with next-generation liposomal adjuvant systems.

Four essential proteins for staphylococcal pathogenesis were selected as vaccine antigens: the adhesins ClfA and FnbpA, involved in tissue colonization and biofilm formation, and toxins α and β , responsible for tissue damage and immune evasion. A relevant contribution of this work was the optimization of the expression of these recombinant antigens in *E. coli* without the use of fusion proteins, with the aim of preserving the native conformation of epitopes and avoiding nonspecific immune responses. The strategies allowed obtaining the antigens in soluble form and with good yields. In parallel, next-generation adjuvant formulations based on cationic liposomes were developed, supplemented with different immunostimulants (IS) such as oligodeoxynucleotides with bovine-specific CpG motifs (CpG-ODN), the synthetic Gemini-type lipopeptide AG2C16, and mannans derived from *Saccharomyces cerevisiae*. Biophysical characterization by dynamic light scattering (DLS) revealed that the incorporation of various immunostimulants modifies the properties of lipid particles. The inclusion of AG2C16 exerts a

stabilizing effect on colloidal suspension by counteracting the aggregation induced by CpG-ODN. Similarly, the incorporation of mannans preserved the stability of the mixture. In both cases, a homogeneous distribution was achieved, an optimal condition to favour uptake by antigen-presenting cells.

The first chapter addresses the characterization of the immune response induced by vaccine formulations in a bovine model. The immunological evaluation was carried out in a trial with Holstein heifers between 8 and 10 months of age, where animals were randomly assigned to seven experimental groups involving control groups and groups immunized with the mixture of recombinant antigens formulated with different adjuvant combinations, either AG2C16, CpG-ODN, mannans, or the combination of CpG-ODN+AG2C16. The immunization protocol consisted of an initial regimen of two doses administered 21 days apart, followed by a booster at eight months. The results demonstrated that liposomal formulations induce a robust and sustained immune response, both humoral and cellular, with a profile predominantly evidenced by significant production of IFN- γ , along with a partial contribution of Th17-type responses (IL-17), considered relevant for the control of pathogens with intracellular persistence capacity. In turn, the application of a booster rapidly raised IgG antibody levels to values like those achieved in the initial regimen and sustained for up to 30 days, demonstrating their ability to induce robust and sustained immunological memory. Based on this performance, the formulations Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec (G3) and Lip+Man+Rec (G4) were selected as the most promising due to their capacity to activate a balanced immunological profile, to proceed with the evaluation of their protective efficacy.

The second chapter of the thesis was aimed at evaluating the protective efficacy of the selected formulations through an experimental controlled intramammary challenge model. At this stage, work was conducted specifically with animals belonging to the groups that showed the best immunological performance: immunized groups G3 (Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec) and G4 (Lip+Man+Rec), along with the untreated control group (C1). These animals received a prepartum booster vaccine dose (30 days before calving) and were challenged intramammarily with a field strain of *S. aureus* 30 days after calving. The application of the booster significantly stimulated serum levels of IgG, IgG1, and IgG2 against rAt, rBt, and rClfA antigens in both immunized groups, successfully restoring titers to levels like those of the initial regimen. At the time of challenge (60 days post-booster), prepartum vaccination generated increased levels of specific IgG in milk across all experimental groups. This response was characterized by the presence of specific IgG1 against all antigens for Lip+Man+Rec, and against rAt, rBt, and rClfA for Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec, with a limited contribution of IgG2. Although prepartum vaccination promoted immunological sensitization of the mammary gland, evidenced by specific antibody levels and early and intense recruitment of CH138A⁺ granulocytes, it failed to prevent

initial colonization or consistently reduce bacteriological persistence. This phenomenon could be associated with an effector uncoupling, characterized by limited availability of opsonizing IgG2 in milk and attenuation of the local inflammatory response, attributable to evasion mechanisms deployed by the *S. aureus* strain used for the challenge.

Overall, this thesis demonstrates that vaccine platforms based on antigenic subunits and liposomal adjuvants can induce robust systemic immune responses in cattle, although protection against *S. aureus* requires overcoming the immunological particularities of the mammary gland. The results obtained provide relevant information for the rational design of new vaccine strategies and suggest that combined approaches, aimed at enhancing local immunity, will be key for the effective control of bovine mastitis.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Mastitis bovina

La mastitis es reconocida mundialmente como la enfermedad más costosa y prevalente que afecta al ganado lechero. Estas pérdidas se deben tanto a la reducción en la producción y calidad de la leche como a los costos asociados al tratamiento antibiótico, descarte de leche, eliminación prematura de animales, medidas preventivas, a lo que se suma la necesidad de asistencia veterinaria especializada (Saran & Chaffer, 2000; Petrovski et al., 2006). La enfermedad se define fundamentalmente como la inflamación de la glándula mamaria (GM) que, si bien puede generarse por lesiones físicas o mecánicas, principalmente es ocasionada por la colonización del tejido mamario por microorganismos que acceden a través del canal de pezón (Zhao & Lacasse, 2008; Calvino, 2019). Ésta puede manifestarse de forma clínica, con signos evidentes como inflamación, fiebre, cambios en el aspecto de la leche (grumos, decoloración, presencia de sangre), o subclínica, en la cual no hay signos visibles, pero sí alteraciones en los recuentos de células somáticas (RCS) y en la composición láctea (Côté -Gravel & Malouin, 2019). Esta última forma representa una gran parte de los casos y es particularmente relevante por su impacto silencioso sobre la productividad del rodeo. En la actualidad un recuento superior a 200.000 células/ml es considerado indicativo de infección intramamaria, y su monitoreo se ha convertido en una herramienta clave para la gestión de la salud mamaria (Ruegg et al., 2017; Kerro & Vidlund, 2024). En este sentido, la correcta identificación del tipo de mastitis y su agente etiológico es fundamental para implementar estrategias de control eficaces y sostenibles en los sistemas de producción lechera.

Los agentes etiológicos de la mastitis bovina se clasifican tradicionalmente en dos grandes grupos según su modo de transmisión y su relación con el canal del pezón: los patógenos contagiosos y los ambientales (Calvino, 2019; Ruegg, 2017). Los primeros, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y diversas especies de *Mycoplasma*, habitan y se multiplican dentro de la glándula mamaria y la piel del pezón, y su diseminación de animal a animal ocurre principalmente durante el proceso de ordeño. En cambio, los patógenos ambientales tienen como reservorio primario el entorno donde se encuentran las vacas, como el suelo, la cama o el agua, siendo los más representativos *Streptococcus uberis* y las bacterias coliformes, como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* (Calvino, 2019; Côté -Gravel & Malouin, 2019). Además, la clasificación del género *Staphylococcus* ha evolucionado con el tiempo; históricamente se distinguía según la producción de coagulasa, pero actualmente se agrupan todas las especies distintas de *S. aureus* bajo el término *Staphylococcus no aureus* (SNA), que incluye tanto coagulasa positivos como negativos, con especies que pueden comportarse como contagiosas o

ambientales según el sistema de producción y manejo aplicado (Calvinho, 2024; Kerro & Vidlund, 2024).

El reconocimiento de la mastitis como una enfermedad multifactorial llevó al desarrollo de estrategias de prevención y control basadas en evidencia. Uno de los aportes conceptuales más importantes en la comprensión de la mastitis bovina fue el modelo de tres fases propuesto por Murphy en 1947, el cual aún hoy sirve como base para entender el desarrollo de las infecciones intramamarias (IIM). Según este modelo, la mastitis se origina en una primera fase de invasión, donde el agente patógeno accede al interior de la glándula tras atravesar el canal del pezón, superando barreras físicas y químicas como el esfínter muscular y el tapón de queratina (Côté-Gravel & Malouin, 2019; Kerro & Vidlund, 2024). Esta entrada puede producirse por exposición directa al entorno o mediante vectores mecánicos durante el proceso de ordeño, aunque no siempre desemboca en una infección establecida (Rainard et al., 2018). La segunda fase, infección, se caracteriza por el establecimiento del microorganismo en el tejido mamario, proceso mediado por mecanismos de adhesión a las células epiteliales y a la matriz extracelular (Zaatout et al., 2020). Finalmente, en la tercera fase, ocurre la inflamación, como respuesta del organismo frente a la presencia del agente infeccioso y sus derivados. Se manifiesta clínicamente por cambios en la leche y el tejido mamario o de forma subclínica mediante alteraciones en la composición de la leche y elevaciones en el RCS (Calvinho, 2019). Este enfoque progresivo resulta fundamental en la práctica veterinaria, ya que permite distinguir entre la mera presencia de bacterias en la glándula y el desarrollo efectivo de la enfermedad, lo que resulta fundamental tanto para el diagnóstico como para el diseño de estrategias de prevención y control (Ruegg, 2017).

Los programas tradicionales de control de la mastitis bovina tienen su origen en las estrategias desarrolladas en la década de 1960, centradas principalmente en prácticas de higiene durante el ordeño. Estas incluyen la desinfección de pezones después del ordeño, el uso de antibióticos durante la lactancia y al inicio del período seco, la eliminación de vacas con infecciones crónicas y el mantenimiento adecuado del equipo de ordeño. Con el paso del tiempo, este enfoque clásico ha sido complementado con nuevas medidas, como el manejo del ambiente, la implementación de protocolos de bioseguridad frente a patógenos contagiosos, el registro sistemático de datos y el monitoreo constante del estado de salud mamaria. Si bien la aplicación rigurosa de estas prácticas ha demostrado ser eficaz en la reducción de infecciones por patógenos contagiosos, el control de patógenos ambientales continúa siendo más complejo, debido a su carácter oportunista y a la diversidad de fuentes de exposición, lo que exige estrategias de manejo más integrales y específicas (Calvinho, 2024; Ruegg, 2017).

Mastitis bovina por S. aureus, mecanismos de acción y evasión

S. aureus es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de IIM en Argentina y en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi et al., 2006; Calvino, 2019; Keane et al., 2019). Una IIM causada por este patógeno, puede manifestarse en formas clínicas con distintos grados de severidad o puede hacerlo con ausencia total de signos macroscópicos visibles de enfermedad, en forma de una infección subclínica (Côté-Gravel & Malouin, 2019). Ésta puede causar daños irreversibles en el tejido mamario y/o volverse una infección crónica, con tasas de curación que en muchos casos no superan el 20% al 50% durante la lactancia (Molineri et al., 2021). Se ha demostrado que la mastitis causada por *S. aureus* varía considerablemente y parece depender de muchos factores, tanto del rebaño como de la vaca y del microorganismo (Barkema et al., 2006; Ster et al., 2021).

S. aureus posee diversos factores de virulencia, los cuales juegan un papel clave en la severidad de IIM que provoca en el huésped. A su vez, este patógeno cuenta con un sofisticado arsenal de mecanismos de evasión inmune que incluye la invasión de células epiteliales, la formación de biopelículas y la transición hacia variantes de colonia pequeña (SCV), mecanismos que le permiten sobrevivir en un estado de latencia protegido tanto de los antibióticos como de los fagocitos del hospedador (Côté-Gravel & Malouin., 2019; Zaatout et al., 2020). La regulación de estos factores está coordinada por una compleja red genética denominada sistema *agr* (*accessory gene regulator*). Este sistema opera como un circuito de percepción de *quórum* (*quorum sensing*) que responde a la acumulación extracelular de un péptido autoinductor (AIP) (Cheung et al., 2011; Tan et al., 2018). Al alcanzar un umbral crítico de densidad celular, el AIP activa el sensor AgrC, desencadenando una cascada de señalización que resulta en la fosforilación de AgrA, el regulador de respuesta. Una vez activado, el sistema *agr* actúa como un regulador maestro, promoviendo la transcripción de la molécula efectora ARNIII, la cual ajusta de manera diferencial el perfil de expresión génica de la bacteria tanto *in vitro* como *in vivo*. Su funcionamiento adecuado es esencial para la transición del modo adherente a un comportamiento más agresivo e invasivo, lo que evidencia su relevancia en el éxito infeccioso de la bacteria (Tan et al., 2018; Cheung et al., 2021). En la fase logarítmica, cuando la densidad bacteriana es baja, predominan la expresión de proteínas de superficie o adhesinas, que facilitan la adherencia inicial a las células del huésped y permiten el establecimiento de la colonización. En cambio, en la fase estacionaria, cuando la densidad celular es alta y la infección ya está instaurada, se induce la expresión y secreción de toxinas (como hemolisinas, leucotoxinas y enterotoxinas) y enzimas degradativas (como proteasas y lipasas), que contribuyen a la diseminación de la bacteria, la adquisición de nutrientes y la evasión del sistema inmunológico. Esta expresión secuencial y coordinada de los factores de virulencia parece estar finamente diseñada para favorecer el proceso infeccioso, desde la adhesión inicial hasta la evasión inmune (Cheung et al., 2021). Además, para persistir en el huésped, *S.*

aureus modula estos factores de forma que favorece su supervivencia intracelular, lo que contribuye a la cronicidad de la infección. En conjunto, esta red reguladora resulta esencial para la patogénesis de *S. aureus* y su capacidad de adaptación al entorno del huésped (Camussone & Calvino, 2013).

El estudio de la mastitis bovina por *S. aureus* abarca una gran cantidad de artículos científicos que se abocan a estudiar la patogénesis del agente etiológico, los factores que favorecen su actividad, los mecanismos de defensa del huésped, las medidas de control o las terapias aplicadas con el fin de reducir su incidencia en los ganados o idealmente, eliminar la enfermedad (Pereira et al., 2011; Camussone & Calvino, 2013).

La mayoría de las cepas clínicas de *S. aureus* expresan una cápsula de polisacáridos, siendo los serotipos 5 (CP5) y 8 (CP8) los más prevalentes en aislamientos de mastitis bovina. Su función primordial es la evasión de la inmunidad innata, ya que protegen a la bacteria de la fagocitosis al dificultar la deposición de las proteínas del complemento (C3 y C3b) y obstruir el reconocimiento por parte de los neutrófilos (Camussone & Calvino, 2013; Scali et al., 2015).

Entre los factores de virulencia más relevantes se encuentran las adhesinas microbianas, ancladas de forma covalente a la pared celular, conocidas como MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Foster et al., 2014). Estas moléculas facilitan la unión específica a componentes de la matriz extracelular (ME) de la glándula mamaria, como fibrinógeno, fibronectina, elastina o colágeno, y desempeñan un papel crucial tanto en etapas iniciales de la colonización como en la formación de biopelículas (Foster et al., 2013; Foster et al., 2019). Dentro de este grupo, se destacan las proteínas de unión a fibronectina (FnbpA y FnbpB), codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*. Estas adhesinas multifuncionales constituyen un factor clave en la patogénesis de *S. aureus* permitiéndole internalizarse e invadir células que normalmente no son fagocíticas, como las células epiteliales mamarias (MEC), células endoteliales y fibroblastos (Burke et al., 2010). A nivel estructural, las Fnbps poseen un dominio A N-terminal compuesto por tres subdominios (N1, N2 y N3), de los cuales N2 y N3 presentan un plegamiento similar a las inmunoglobulinas y median la adhesión al fibrinógeno y la elastina mediante el mecanismo dinámico conocido como acoplar, bloquear y asegurar (*dock, lock and latch*, DLL). En este mecanismo, el péptido de la cadena γ del fibrinógeno se ancla en un surco hidrofóbico entre N2 y N3 y queda fijado mecánicamente mediante un cambio conformacional que lo "atrapa" en su lugar. Por el contrario, la unión a la fibronectina se produce a través de repeticiones en tándem (FnBRs) localizadas en una región desestructurada distal al dominio A. Estas repeticiones utilizan un mecanismo de "beta-cremallera en tándem" para unirse a la fibronectina, la cual actúa como un puente molecular con las integrinas $\alpha 5 \beta 1$ de la membrana celular del hospedador (Edwards et al., 2010; Camussone & Calvino, 2013). Esta interacción

desencadena la remodelación del citoesqueleto de actina, facilitando que la bacteria sea engullida por la célula (Loffer et al., 2014). Es importante resaltar que existe una alta variabilidad antigénica entre los diferentes isotipos de FnBPs en cepas de origen bovino, lo que sugiere que estas variaciones funcionan como un sofisticado mecanismo de evasión inmune (Burke et al., 2010). Otras de las MSCRAMMs de gran trascendencia son los factores de agregación (*Clumping Factors*, ClfA y ClfB), los cuales desempeñan roles bifuncionales críticos tanto en la adhesión tisular como en la evasión del sistema inmune (Foster et al., 2013). Particularmente, el ClfA posee la capacidad de unirse al fibrinógeno plasmático (específicamente al extremo C-terminal de la cadena γ) mediante el mecanismo dinámico DLL similar a Fnbp, lo que resulta en la aglutinación o aglomeración instantánea de las células bacterianas en presencia de plasma (Ganesh et al., 2008). Como molécula de adhesión polifacética, el ClfA media la interacción con la célula del hospedador a través de dos vías principales: mediante un puente de fibrinógeno que le permite unirse a la integrina $\alpha V\beta 3$ en la superficie celular, o bien interactuando directamente con el receptor anexina A2 en las células epiteliales mamarias bovinas de manera independiente del fibrinógeno (Foster et al., 2019) Además, ClfA contribuye a la evasión del sistema inmune inhibiendo la fagocitosis mediada por neutrófilos mediante la escisión de C3b, en un proceso dependiente del regulador del complemento factor I (Scali et al., 2015; Campos et al., 2022). Dentro del grupo de las MSCRAMMs se incluyen también las proteínas de la familia Sdr (SdrD y SdrE), caracterizadas por la presencia de dominios repetidos ricos en serina y ácido aspártico que proyectan sus dominios de unión hacia el exterior de la superficie bacteriana. SdrD participa activamente en la adherencia bacteriana mediante su interacción con receptores del hospedador, como la desmogleína-1, mientras que SdrE contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria al secuestrar el factor H del sistema del complemento, lo que inhibe la activación de la cascada del complemento y reduce la deposición de opsoninas sobre la bacteria (Foster et al., 2013; Campos et al., 2022)

La acción coordinada de las adhesinas FnbpA y ClfA no solo sostiene la colonización del tejido mamario, sino que también impulsa la formación de biopelículas. Estas son definidas como comunidades multicelulares complejas encerradas en una matriz extracelular autoproducida compuesta por proteínas, exopolisacáridos y ADN extracelular (eDNA) (Allison, 2003; Moormeier & Bayles, 2017). Estas estructuras se consideran un mecanismo de patogénesis esencial para la supervivencia del microorganismo en la glándula mamaria, confiriéndole resistencia superior frente a la fagocitosis y la terapia antibiótica Su formación está mediada genéticamente por el operón *icaADBC*, encargado de sintetizar la adhesina intercelular de polisacárido (PIA/PNAG) y la proteína Bap (*biofilm associated protein*). Bap, facilita la adhesión inicial a superficies y la persistencia en la glándula mamaria, siendo capaz de inducir la formación del biofilm incluso en ausencia de los productos del operón *ica*. A su vez, presenta una notable

variación en el número de repeticiones en tándem de su región C durante el transcurso de la infección, lo que funciona como una estrategia de adaptación y posible evasión del sistema inmune del hospedador (Cucarella et al., 2004). Adicionalmente, *S. aureus* ha desarrollado sofisticadas estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedador, entre las cuales destaca la producción de proteínas que interfieren directamente con el depósito y la función de las inmunoglobulinas (Thammavongsa et al., 2015). Una de las más estudiadas es la proteína A de superficie (SpA), una molécula anclada de forma covalente a la pared celular que se expresa prácticamente en todos los aislamientos clínicos. SpA posee la capacidad de unirse de manera no específica a la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG) impidiendo el reconocimiento por parte de los receptores de Fc en fagocitos (neutrófilos), dificultando la opsonización y la fagocitosis mediada por anticuerpos y bloqueando la activación de la vía clásica del complemento. Además de su rol en la inmunidad innata, la SpA manipula la respuesta adaptativa al unirse a la región Fab de la IgM (específicamente del clan VH3) expuesta en los linfocitos B, actuando como un potente superantígeno de células B, lo que induce la apoptosis de estas células y desvía la respuesta inmune hacia la producción de anticuerpos dirigidos casi exclusivamente contra la propia proteína A, en lugar de hacia otras estructuras antigénicas más relevantes para la eliminación del patógeno (Kim et al., 2012; Scali et al., 2015; Thammavongsa et al., 2015; Demontier et al., 2021). Complementando esta acción, *S.aureus* secreta la proteína Sbi (*Staphylococcal binder of immunoglobulin*), la cual también secuestra IgG y se asocia con los factores H y C3 del complemento para promover su degradación, bloqueando así los vínculos moleculares entre las respuestas innata y adaptativa (Kim et al., 2012)

Además de las adhesinas de superficie, *S. aureus* secreta diversas toxinas, liberadas principalmente durante la fase pos-logarítmica de crecimiento. Estas moléculas no solo destruyen tejidos para obtener nutrientes, sino que manipulan activamente la respuesta inmune para facilitar la cronicidad (Kerro & Vidlund, 2024). Entre ellas, la α -toxina (α -hemolisina, Hla) es una de las más estudiada. Es producida por el 95% de las cepas y presenta citotoxicidad frente a un amplio rango de células de mamífero, incluyendo eritrocitos, células epiteliales, fibroblastos, monocitos, macrófagos y linfocitos. Su función principal es degradar el tejido del huésped para obtener nutrientes y favorecer la supervivencia del patógeno (Camussone & Calvino, 2013; Scali et al., 2015; Di Bella et al., 2025). Ésta se considera un factor clave en la persistencia intracelular, ya que puede inducir una autofagia disfuncional en la célula infectada, impidiendo la fusión de autofagosomas con lisosomas y generando un nicho protector para la replicación bacteriana (Loffer et al., 2014). Su mecanismo de acción varía según la concentración: a bajas concentraciones se une al receptor de membrana ADAM10, promoviendo la formación de un poro heptamérico que permite el eflujo de ATP y K^+ , el ingreso de Ca^{2+} y la fragmentación de ADN, induciendo apoptosis; a concentraciones elevadas, se inserta de forma inespecífica en la bicapa

lipídica, formando grandes poros que desencadenan necrosis masiva y activan respuestas celulares secundarias (Di Bella et al., 2025). Un impacto crítico de esta toxina en la ubre es la escisión de la E-cadherina mediante la activación de ADAM10, lo que rompe las uniones adherentes del epitelio, destruye la barrera mamaria y permite la invasión de tejidos profundos. Adicionalmente, el microorganismo fagocitado puede secretar Hla para lisar células endoteliales bovinas, lo que favorece la liberación y diseminación sistémica de las bacterias que se encontraban en refugios intracelulares (Grumann et al., 2014; Otto, 2014; Campos et al., 2022).

La β -hemolisina (Hlb), también conocida como β -toxina, es una exoproteína hemolítica que actúa como una esfingomielinasa de tipo C dependiente de magnesio (Otto, 2014). Esta enzima, hidroliza la esfingomielina de la membrana plasmática, generando fosocolina y ceramida, acción que provoca un incremento de la permeabilidad y una pérdida progresiva de la carga superficial celular, lo que facilita la adherencia bacteriana y vuelve a las células significativamente más susceptibles a la acción de otras toxinas (Camussone & Calvino, 2013; Campos et al., 2022). Aunque presenta menor citotoxicidad que Hla, produce un efecto sinérgico cuando ambas toxinas están presentes potenciando la necrosis tisular. En el contexto de la infección mamaria, la Hlb ejerce efectos linfotóxicos y lisa de manera eficiente los eritrocitos bovinos, lo que permite a la bacteria liberar hemoglobina para la adquisición de hierro, un nutriente esencial para su crecimiento. Asimismo, se ha observado que la presencia de Hlb en la ubre induce un influjo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) hacia los alvéolos y la formación de edema (Oliveira et al., 2018; Campos et al., 2022; Di Bella et al., 2025).

Otra de las toxinas de gran relevancia secretadas por *S.aureus* son las leucotoxinas. Estas constituyen una familia de toxinas bicomponentes solubles que requieren el ensamblaje coordinado de dos subunidades proteicas distintas, denominadas S (especificidad) y F (formación de poro), para constituir poros octaméricos de barril beta en la membrana de las células blanco. Su mecanismo de acción es estrictamente dependiente de receptores específicos, lo que determina una altísima selectividad tanto de especie como de tipo celular (Otto, 2014; Di Bella et al., 2025). Dentro de este grupo, la toxina LukMF¹ es la de mayor trascendencia en rumiantes; su unión al receptor CCR1 en neutrófilos, macrófagos y monocitos resulta crítica (Hoekstra et al., 2018). Este arsenal se complementa con LukED, que compromete la inmunidad innata y adaptativa al interactuar con los receptores CCR5 y CXCR1/2, y con LukAB, la cual utiliza la integrina CD11b para facilitar el escape bacteriano desde el fagosoma mediante la lisis del leucocito post-fagocitosis. Asimismo, la gamma hemolisina (Hlg AB/CB), de presencia ubicua, promueve la adquisición de hierro y la lisis celular vía CXCR1/2 y C5aR, mientras que la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), aunque agresiva contra el receptor C5aR, es excepcional en aislamientos de mastitis bovina (Otto, 2014; Thammavongsa et al., 2015; Di Bella et al., 2025)

Adicionalmente, *S. aureus* emplea el sistema de determinantes de superficie regulados por hierro (Isd) para su adquisición como nutriente. Dentro de este sistema, IsdB actúa como receptor de hemoglobina anclado a la pared celular, permitiendo la extracción del grupo hemo para satisfacer las necesidades metabólicas bacterianas y, adicionalmente, favoreciendo la adhesión e internalización en células no fagocíticas mediante su interacción con integrinas $\beta 3$ del hospedador. Por su parte, IsdH facilita la captación de hemo al unirse a haptoglobina y a complejos haptoglobina-hemoglobina (Foster et al., 2013; Scali et al., 2015)

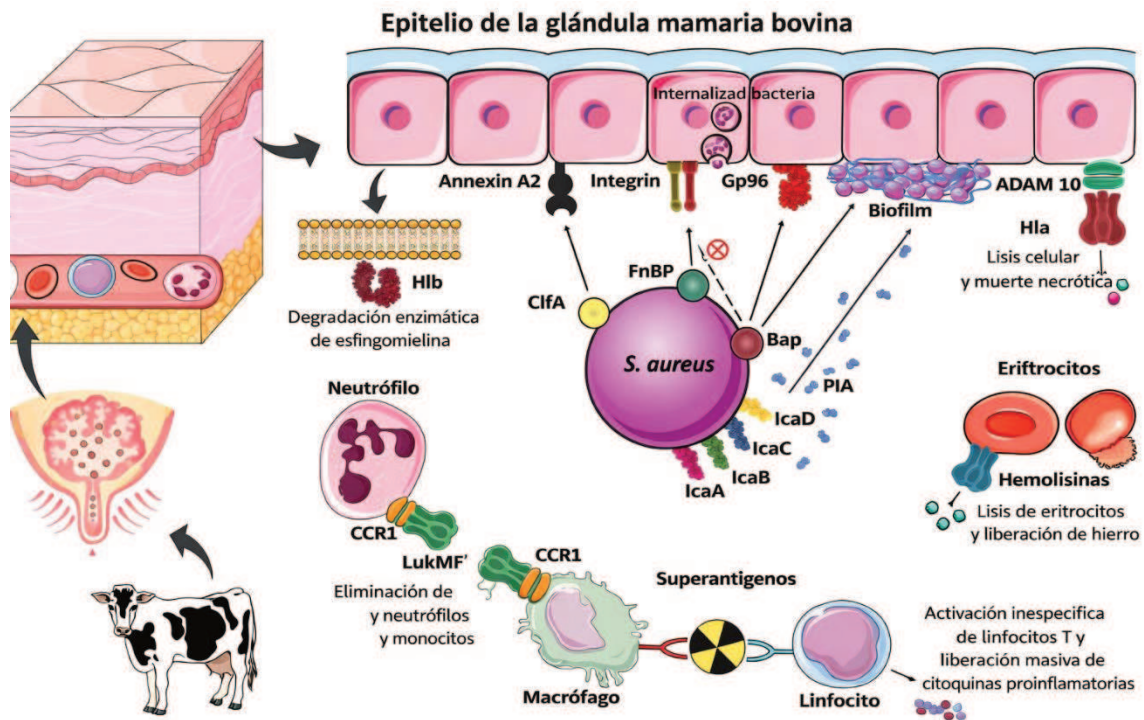


Figura 1. Proteínas implicadas en la patogénesis de *S. aureus* bovino. Las proteínas de superficie interactúan con componentes del hospedador para promover la adhesión e invasión bacteriana. La proteína asociada a biopelículas (Bap) interfiere en la vía de internalización mediada por Fnbps y contribuye a la formación de biopelículas, proceso dependiente también del locus ica. Las toxinas, como las hemolisinas alfa y beta, inducen la necrosis del tejido de la glándula mamaria y la hemólisis de eritrocitos bovinos para la adquisición de hierro a partir de la hemoglobina. La leucotoxina LukMF' se une específicamente a los neutrófilos presentes en la leche, mientras que los superantígenos estafilocócicos inducen una activación inespecífica de células T, desencadenando la liberación masiva de citoquinas proinflamatorias. Imagen adaptada de Campos et al., 2022.

Como se mencionó anteriormente en este capítulo, las prácticas utilizadas para disminuir la incidencia de las IIM o acortar su duración, se basan principalmente en la higiene durante el ordeño, y el uso de terapia antibiótica de casos clínicos durante la lactancia y de casos subclínicos al inicio del periodo seco. Con estas aplicaciones se logró un gran progreso en el control de IIM causadas por algunos patógenos contagiosos. Sin embargo, las características patogénicas de *S. aureus* hacen que estas prácticas no sean completamente efectivas (Zhao & Lacasse, 2008) para

la curación de casos crónicos y para eliminar por completo la infección en el cuarto mamario afectado (Waage et al., 2000). El carácter crónico de la mayoría de las IIM por *S. aureus* y la tasa limitada de cura luego de la terapia antibiótica clásica la convierten en una enfermedad difícil de controlar (Zecconi et al., 2006). Además, el uso infructuoso de antimicrobianos (AM) frente a casos crónicos por *S. aureus* favorece la aparición de cepas bacterianas resistentes a AM (RAM) (Molineri et al., 2021), proceso que se ve potenciado por la capacidad de transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias (Lindsay, 2014). En este sentido, se ha reportado que la mayor prevalencia global de resistencia en *S. aureus* se observa frente a penicilina, seguida de clindamicina, eritromicina y gentamicina, mientras que ceftiofur y cefalotina presentan las menores prevalencias globales de RAM. Asimismo, la RAM a casi todos los antimicrobianos evaluados ha mostrado una tendencia creciente en el tiempo, más evidente a partir de 2009, destacando el incremento para clindamicina, gentamicina y oxacilina (Molineri et al., 2021).

Sobre la base de los antecedentes expuestos resulta de prioritario desarrollar estrategias de prevención, como la vacunación, que permitan reducir la incidencia de las infecciones intramamarias, mitigar las pérdidas productivas y optimizar el uso de AM para minimizar la emergencia de RAM (Middleton, 2008). Sin embargo, el diseño de inmunógenos eficaces se enfrenta a la notable plasticidad de *S. aureus* para evadir la respuesta inmune del hospedador. Sus estrategias de evasión incluyen la inhibición de la opsonización, la neutralización de péptidos antimicrobianos y la destrucción directa de células inmunitarias, lo que dificulta el establecimiento de una protección duradera. Por consiguiente, el desarrollo de terapias alternativas requiere de vacunas que contemplen múltiples blancos antigénicos, capaces de inducir una respuesta inmunitaria integral, tanto humoral como celular, en las diferentes etapas de la infección (Clegg et al., 2021)

Vacunas para IIM causadas por S.aureus

En el ámbito veterinario, se han desarrollado numerosas vacunas experimentales contra IIM por *S. aureus*, aunque la complejidad del patógeno ha impedido alcanzar una protección completa (Pereira et al., 2011; Rueg, 2017). Las dos opciones principales que han alcanzado la fase comercial son: i) Lysigin® (Boehringer Ingelheim), basada en un lisado bacteriano de cinco cepas que incluye los serotipos capsulares CP5, CP8 y 336, formuladas con un adyuvante a base de hidróxido de aluminio y ii) Startvac® (Laboratorios Hipra), una vacuna polivalente que contiene *Staphylococcus aureus* inactivado (cepa SP140) que expresa el Complejo Antigénico Asociado a Exopolisacárido (SAAC) y *Escherichia coli* (J5) inactivada, formulada con un adyuvante de base oleosa. Si bien ambas vacunas han demostrado ser útiles para reducir la severidad clínica y la duración de los síntomas, su efectividad para prevenir el establecimiento de nuevas infecciones

sigue siendo inconsistente y motivo de debate. En estudios iniciales la aplicación de 2 dosis de Lysigin® en terneras de 6 meses, seguida de un refuerzo cada 6 meses, hasta el momento del parto, resultó en una reducción del 45% de nuevas IIM por *S. aureus* durante la preñez y el parto, relativo a controles sin inmunizar (Nickerson et al., 1999). Sin embargo, ensayos realizados con vacas en lactancia no mostraron una reducción significativa en la tasa de nuevas IIM ni mejoras en los RCS (Middleton, 2008). Respecto a Startvac®, aunque algunos estudios reportaron una reducción del 45% en la tasa de transmisión en rodeos específicos, otros ensayos de campo no han logrado confirmar una disminución significativa de la incidencia, lo que sugiere que su eficacia depende estrechamente del manejo de la granja y de la diversidad de cepas locales (Schukken et al., 2014; Scali et al., 2015).

Diversos autores han propuesto que la transición hacia estrategias de vacunación más efectivas contra *Staphylococcus aureus* surge del reconocimiento de que las bacterinas y los lisados convencionales, obtenidos en tiempos fijos de cultivo, no logran capturar el dinamismo antigénico que el patógeno despliega durante una IIM real (Scali et al., 2015; Côté-Gravel & Malouin, 2019). Esta falta de eficacia ha llevado a un replanteo en la estrategia vacunal, priorizando el uso de formulaciones multicomponente que combinen antígenos de diferentes clases funcionales, como adhesinas para bloquear la colonización inicial, toxinas para prevenir el daño tisular y proteínas de superficie para facilitar la depuración inmunológica, formuladas con adyuvantes capaces de modular la respuesta inmune de forma más precisa (Middleton, 2008; Anderson et al., 2012; Scali et al., 2015). Se ha propuesto que una vacuna eficaz contra *S. aureus* debe inducir una respuesta inmunológica multifacética, que incluya la producción de anticuerpos capaces de neutralizar toxinas y facilitar la opsonofagocitosis, así como una respuesta celular efectiva que promueva el reclutamiento de fagocitos al sitio de infección (Bagnoli et al., 2012; Clegg et al., 2021). En particular, se reconoce que los anticuerpos por sí solos no son suficientes, especialmente contra un patógeno con persistencia intracelular (Joshi et al., 2013). Las respuestas Th17 son esenciales para el reclutamiento masivo y rápido de neutrófilos al sitio de infección mediante la liberación de IL-17. Por su parte, la inmunidad Th1 (asociada al IFN- γ) es determinante para activar la capacidad bactericida de los macrófagos y controlar a las bacterias que se refugian dentro de las células del hospedador (Clegg et al., 2021). Para lograr esta respuesta equilibrada, el uso de adyuvantes de nueva generación y plataformas avanzadas es indispensable (Bagnoli et al., 2012).

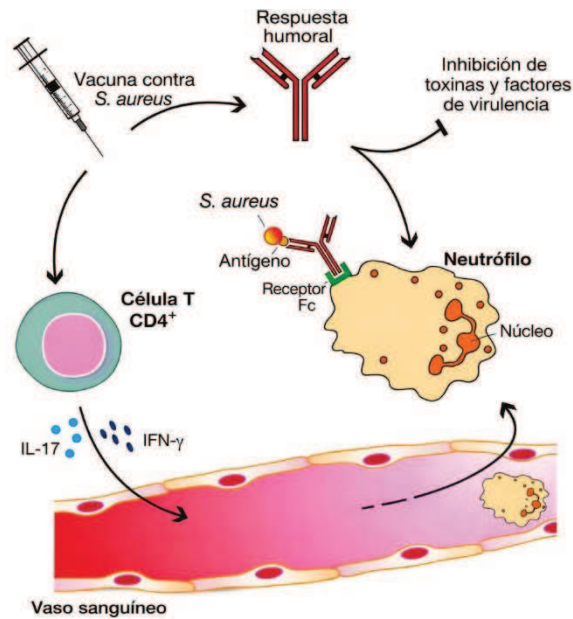


Figura 2: Estrategias terapéuticas y mecanismos de protección frente a *S. aureus*. Las vacunas protectoras deberían ser capaces de inducir tres respuestas inmunes principales: i) anticuerpos que inhiban directamente la viabilidad bacteriana y/o su toxicidad; ii) anticuerpos que medien la opsonofagocitosis; iii) inmunidad mediada por células que estimule el reclutamiento de fagocitos en el sitio de la infección. Imagen adaptada de Bagnoli et al., 2012.

Estrategias alternativas frente a *S. aureus*

Paralelamente al desarrollo de vacunas preventivas contra *S. aureus*, han cobrado relevancia nuevas estrategias terapéuticas inmunológicas. Entre ellas se destacan el uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos a toxinas claves, como la α -toxina o las leucocidinas, la administración de inmunomoduladores que potencien la actividad de células presentadoras de antígenos y linfocitos T, así como el uso de bacteriófagos (Clegg et al., 2021).

Si bien la mayoría de las investigaciones sobre anticuerpos monoclonales (mAbs) se centran en aplicaciones humanas, se han evaluado antígenos específicos de microorganismos que infectan rumiantes como la leucocidina LukMF¹ y la proteína de unión al fibrinógeno Efb (Boerhout et al., 2015). Estudios de inmunización pasiva en modelos de ratón han demostrado que el uso de mAbs dirigidos contra ClfA y polisacáridos capsulares puede reducir significativamente la carga bacteriana en el tejido mamario (Bagnoli et al., 2012; Scali et al., 2015). Sin embargo, la evaluación clínica directa de mAbs en vacas es limitada, y las investigaciones actuales se enfocan más en la capacidad de las vacas para generar anticuerpos con capacidad neutralizante tras la vacunación, observándose que la vía subcutánea es particularmente efectiva para inducir estos efectores en el suero y la leche (Boerhout et al., 2015).

Respecto a la terapia con bacteriófagos, se ha validado la eficacia de cócteles de fagos purificados en modelos de ratón para mastitis bovina, logrando una reducción de la carga bacteriana de hasta 4 órdenes de magnitud y una mejora notable en la patología tisular. A pesar de estos resultados prometedores *in vivo* e *in vitro*, los ensayos clínicos en ganado lechero han enfrentado desafíos históricos, como la inhibición de la actividad lítica por proteínas del suero lácteo y la agregación bacteriana, lo que resultó en tasas de curación modestas que no alcanzaron significancia estadística (Breyne et al., 2017; Titze et al., 2020).

Finalmente, en cuanto a los inmunomoduladores, ya existen productos comerciales en el ámbito veterinario como el pegbovigrastim (factor estimulante de colonias de granulocitos), diseñado para restaurar la función de los neutrófilos en vacas durante el período periparto, etapa de máxima susceptibilidad a las infecciones (Côté-Gravel & Malouin, 2019). Asimismo, se han explorado extractos vegetales como el de *Panax ginseng*, que han mostrado capacidad para reducir la internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas *in vitro*, aunque su eficacia clínica definitiva aún requiere pruebas de campo más extensas (Calvinho, 2019).

Considerando que el carácter crónico de las infecciones intramamarias por *S. aureus* y la limitada eficacia de las terapias y vacunas comerciales actuales plantean un desafío crítico para la industria lechera, resulta de especial importancia desarrollar nuevas estrategias de prevención. Dado que este patógeno utiliza un sofisticado arsenal de factores de virulencia, destacándose adhesinas como ClfA y FnbpA para la colonización inicial y toxinas como la α y β -hemolisina para el daño tisular y la evasión inmune, la transición hacia vacunas multicomponente se presenta como la vía más prometedora. Se postula que la combinación de estos antígenos recombinantes, formulados con sistemas adyuvantes de última generación, permitirá inducir una respuesta inmunitaria integral, tanto humoral como celular, capaz de superar los mecanismos de persistencia bacteriana. Sobre esta base, el presente trabajo de tesis se propone como objetivo general obtener un inmunógeno prototípico contra la mastitis bovina y evaluar su capacidad de protección en un modelo de infección experimental.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener un inmunógeno prototípico contra mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*, formulado con un adyuvante propio de última generación, y estudiar la respuesta inmune y capacidad de protección generada en bovinos inmunizados frente a una infección experimental.

Objetivos particulares

- 1- Obtener y optimizar la expresión de los antígenos recombinantes α -toxina, β -toxina, ClfA, FnBPA de *S. aureus*.
- 2- Obtener diferentes formulaciones adyuvantes, compuestas por liposomas catiónicos cargados con distintos inmunoestimulantes
- 3- Obtener vacunas experimentales compuestas por los antígenos recombinantes α -toxina, β -toxina, ClfA, FnbpA de *S. aureus*, formuladas con cada uno de los sistemas adyuvantes obtenidos, y evaluar su desempeño en modelo bovino.
- 4- Seleccionar la formulación experimental que mejor desempeño haya demostrado en modelo bovino.
- 5- Caracterizar la respuesta inmune y capacidad de protección generada en vaquillonas por la inmunización con la formulación seleccionada y luego de un desafío experimental por vía intra-mamaria.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y uso de vacunas novedosas puede mitigar los efectos adversos de las enfermedades infecciosas en el ganado, proteger el bienestar animal y reducir las pérdidas económicas. En este sentido, las vacunas constituyen una herramienta indispensable para la prevención efectiva de patologías bovinas, así como para garantizar una vigilancia inmunológica duradera. Actualmente, existen diferentes tipos de vacunas que se clasifican según su método de preparación: las tradicionales, como las inactivadas y las vivas atenuadas, y las de ingeniería genética, entre las que se incluyen las vacunas de subunidades, de ADN, de vectores vivos, de partículas similares a virus y con delección génica (Depelseñaire et al., 2017; Yao et al., 2023). La formulación vacunal desempeña un papel crucial en la determinación del tipo de respuesta inmune que se genera. En particular, las vacunas de subunidades dirigidas contra factores de virulencia seleccionados de los microorganismos patógenos ofrecen una estrategia racional y moderna para el control de enfermedades infecciosas. Este tipo de formulaciones presenta ventajas relevantes frente a las vacunas tradicionales, ya que, al contener únicamente antígenos específicos logran inducir una respuesta inmune dirigida y minimizan los riesgos asociados al uso de microorganismos vivos atenuados o inactivados (Hajissa et al., 2019).

En el caso de las infecciones por *S. aureus*, se han identificado diversos antígenos como candidatos para su aplicación en vacunas de subunidades. Vacunas desarrolladas para prevenir infecciones por *S. aureus* en humanos han evaluado desde los polisacáridos capsulares tipo 5 y 8 (CP5 y CP8), proteínas de adquisición de hierro IsdB e IsdH, proteínas de la familia serina-ácido aspártico SdrD y SdrE, hasta proteínas de adhesión como *Clumping Factor A* (ClfA), Proteína de unión a fibronectina (Fnbp) A y B, así como variantes de la proteína A (SpA), que han mostrado eficacia protectora en modelos animales (Stranger-Jones et al., 2006; Kim et al., 2011; Bagnoli et al., 2012; O'Brien & McLoughlin, 2019). En estudios sobre vacunas contra *S. aureus* en bovinos, se han evaluado diversos antígenos de superficie y toxinas como candidatos para su aplicación en vacunas de subunidades. Entre ellos se incluyen los polisacáridos CP5 y CP8 y proteínas de adhesión como ClfA y FnbpA y B (Castagliuolo et al., 2006; Camussone et al., 2013; 2014a). Además, se han probado toxoides y enterotoxinas estafilocócicas, como enterotoxina estafilocócica tipo C (SEC) y leucocidina Pantón-Valentine (PVL), entre otras (Shkreta et al., 2004; Chang et al., 2008; Middleton, 2008; Pereira et al., 2011). Los desarrollos actuales en vacunas contra la mastitis por *S. aureus* se orientan hacia plataformas de subunidades inmunogénicas y nuevas vías de administración para superar las limitaciones de las bacterinas tradicionales. Investigaciones lideradas por Misra et al., (2018) y Alabdullah et al., (2021)

evaluaron la eficacia de una plataforma basada en quimeras de las subunidades A2 y B de la toxina del cólera (CTA2/B). En esta formulación, los antígenos IsdA y ClfA se fusionan genéticamente a la subunidad CTA2, formando una molécula similar a la holotoxina pero carente del dominio tóxico A1. Administrada por vía intranasal en dosis de entre 600 y 1200 μg , esta vacuna aprovecha la capacidad adyuvante mucosa de la CTA2/B para estimular la respuesta sistémica. Los autores reportaron una expansión significativa de células T CD4⁺ y la inducción de un perfil tipo Th2 mediante la expresión de IL-4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Adicionalmente, Alabdullah et al., (2021) observaron que esta plataforma logra una activación celular temprana, caracterizada por un aumento significativo en la expresión IFN γ en las PBMCs. Complementariamente, Merrill et al., (2019) exploraron el potencial de las proteínas de superficie estafilocócicas utilizando cepas tanto de *S. aureus* (SASP) como de *S. chromogenes* (SCSP). Su formulación de antígeno purificado, combinada con el adyuvante oleoso Emulsigen-D, fue administrada por vía subcutánea. Este enfoque sistémico resultó altamente inmunogénico, elevando significativamente los títulos de IgG1 e IgG2 en suero durante el periodo de secado. Mientras que las SASP indujeron una respuesta polarizada hacia IgG2 (asociada al perfil Th1), la formulación basada en SCSP destacó por generar una respuesta humoral robusta mediada por IgG1.

En todos los casos, el objetivo de la vacunación se encuentra dirigido a inducir una respuesta inmune protectora capaz de prevenir la aparición de nuevas IIM por *S. aureus* y reducir el tiempo de infección (Ruegg, 2017).

Para este desarrollo nos enfocamos en cuatro proteínas involucradas en distintas etapas de la IIM: ClfA, FnbpA, Hla (At) y Hlb (Bt). Como mencionamos anteriormente, en términos generales, ClfA media la interacción entre la bacteria y el fibrinógeno plasmático, provocando la aglutinación de las células bacterianas; FnbpA participa en la internalización de *S. aureus* en células epiteliales y fagocíticas; mientras que las Hla y Hlb son proteínas secretadas que inducen daño en las células del hospedador (Camussone & Calvino, 2013). En estudios anteriores, la inmunización de vaquillonas con dichos antígenos, formulados con un adyuvante comercial de nueva generación, indujo la producción de anticuerpos específicos en sangre y leche (Camussone et al., 2014b; Renna et al., 2014). A su vez, estudios funcionales *in vitro* demostraron que los anticuerpos generados contra estos antígenos redujeron de forma significativa la adherencia bacteriana a fibronectina (-73%) y fibrinógeno (-67%), inhibieron la invasión de células epiteliales mamarias (reducción del 84,3 % de la internalización bacteriana), disminuyeron el título hemolítico de la β -hemolisina nativa (~6 veces) y potenciaron la fagocitosis por neutrófilos tanto en proporción como en intensidad (Pujato et al., 2018). Asimismo, en un ensayo a campo *in vivo*, una vacuna a subunidades compuesta por α -toxina, β -toxina, FnbpA y ClfA formulada con liposomas catiónicos y CpG-ODN incrementó los títulos en sangre y leche de IgG, IgG1 e IgG2

frente a todos los antígenos incluidos, redujo la actividad hemolítica de la α -toxina nativa y logró una disminución del 60,7% en la incidencia de nuevas infecciones intramamarias por *S. aureus* y un retraso en su aparición bajo condiciones de exposición natural, aunque dichas diferencias no alcanzaron significancia estadística (Camussone et al., 2022).

Las vacunas a subunidades o peptídicas dependen en gran medida de la acción de los adyuvantes para alcanzar una respuesta inmune adecuada, ya que por sí solas suelen presentar baja inmunogenicidad. En este contexto, los adyuvantes se convierten en un componente esencial, pues no solo incrementan la capacidad del antígeno para inducir respuestas específicas, sino que también favorecen la activación de células presentadoras de antígeno y la generación de memoria inmunológica a largo plazo (Pati et al., 2018; Petkar et al., 2021). Su selección y diseño resultan, por tanto, factores críticos para obtener una respuesta protectora eficaz, equilibrada y segura. Funcionalmente, los adyuvantes pueden clasificarse en inmunoestimulantes clásicos, que activan directamente células inmunes a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRP), y en sistemas de liberación, que protegen a los antígenos de la degradación y facilitan su transporte a tejidos linfoides. Dentro de estos últimos, los sistemas particulados, como emulsiones, nanopartículas y liposomas, ofrecen ventajas notables, ya que además de preservar la integridad del antígeno, optimizan su entrega a las células inmunes y promueven respuestas más robustas y duraderas (Pati et al., 2018; Petkar et al., 2021; Azuar et al., 2022).

Si bien en las últimas décadas se han evaluado diversos adyuvantes y sistemas de liberación (*delivery*) de antígenos en inmunógenos experimentales, la mayoría de las vacunas veterinarias disponibles comercialmente incluyen adyuvantes tradicionales como el hidróxido de aluminio o los adyuvantes oleosos. Los adyuvantes de nueva generación combinan un sistema de *delivery* con un inmunoestimulante, lo que permite optimizar la eficacia de las vacunas mediante múltiples mecanismos. Esta sinergia puede, entre otras propiedades, potenciar la respuesta inmunitaria frente a antígenos de baja inmunogenicidad, inducir una protección más duradera, orientar el tipo de respuesta inmune deseada, y reducir tanto la cantidad de antígeno como el número de dosis necesarias para alcanzar una protección efectiva (Buonsanti & D'Oro, 2017). Dado que estos efectos dependen en gran medida de las señales iniciales que activan el sistema inmune innato, es fundamental seleccionar cuidadosamente tanto el sistema de *delivery* como los inmunoestimulantes adecuados.

Entre los adyuvantes de nueva generación, los liposomas han emergido como una plataforma prometedora gracias a su versatilidad y capacidad para proteger componentes activos de la degradación. Según su morfología, se clasifican en vesículas unilamelares (ULVs) formadas por una sola bicapa que rodea un núcleo acuoso, que incluyen vesículas pequeñas (SUVs, <100 nm) y grandes (LUVs, hasta varios micrómetros) y en vesículas multilamelares (MLVs), compuestas

por múltiples bicapas concéntricas separadas por compartimentos acuosos (Marasini et al., 2017; Chatzikleanthous et al., 2021). El tamaño de partícula es un factor determinante en su destino biológico e inmunogenicidad. Mientras que los liposomas pequeños (<200 nm) son transportados libremente a través de los capilares linfáticos, las vesículas de mayor tamaño tienden a persistir en el sitio de inyección, favoreciendo un efecto depósito que prolonga la liberación del antígeno. (Tandrup Schmidt et al., 2016; Marasini et al., 2017; Petkar et al., 2021). Se ha reportado que un rango de tamaño entre 100 y 200 nm es ideal para optimizar la endocitosis mediada por receptores, facilitando una captura eficiente por parte de las células presentadoras de antígenos (CPAs) (Li et al., 2013; Marasini et al., 2017) A su vez, factores como la composición lipídica, la carga superficial y el método de fabricación son esenciales para controlar estas propiedades físicas y modular la respuesta inmunitaria resultante (Schmidt et al., 2016; Marasini et al., 2017)

Su relevancia como sistemas de liberación se debe a que: i) su estructura de bicapa lipídica permite encapsular antígenos e IS, protegiéndolos de la degradación, facilitando su liberación controlada, mejorando la presentación antigénica y potenciando la activación de las CPAs; ii) presentan características biocompatibles y biodegradables, con toxicidad mínima o nula; y iii) ofrecen una gran flexibilidad para modificar sus propiedades fisicoquímicas, lo que los convierte en un sistema versátil y adaptable a distintos tipos de vacunas (Schwendener et al., 2014; Marasini et al., 2017).

La flexibilidad de los liposomas radica en su estructura anfifílica, que permite la combinación con distintos IS variando tanto el tipo como el lugar de interacción. La incorporación de componentes activos, como antígenos y adyuvantes, junto con ligandos de direccionamiento, puede lograrse mediante tres estrategias principales (Tandrup Schmidt et al., 2016; Chatzikleanthous et al., 2021). En primer lugar, la encapsulación, se utiliza para incorporar moléculas hidrofílicas en el núcleo acuoso o moléculas hidrofóbicas en la bicapa lipídica. Este proceso no solo protege a los componentes de la degradación enzimática o proteolítica en el entorno *in vivo*, sino que también facilita una liberación sostenida del antígeno, prolongando el efecto inmunoestimulante. En segundo lugar, la unión electrostática se fundamenta en la atracción entre cargas opuestas en la superficie del nanocarrier. Por ejemplo, los liposomas catiónicos son especialmente efectivos para adsorber antígenos o adyuvantes con carga negativa (como el ADN o ARN), formando complejos estables que mejoran la interacción con las membranas celulares y facilitan la captura por parte de las CPA. Finalmente, la conjugación covalente, que enlaza ligandos de direccionamiento a anclas lipídicas funcionalizadas en la superficie de los liposomas, facilitando así la liberación dirigida (Schmidt et al., 2016; Rao et al., 2020; Chatzikleanthous et al., 2021)

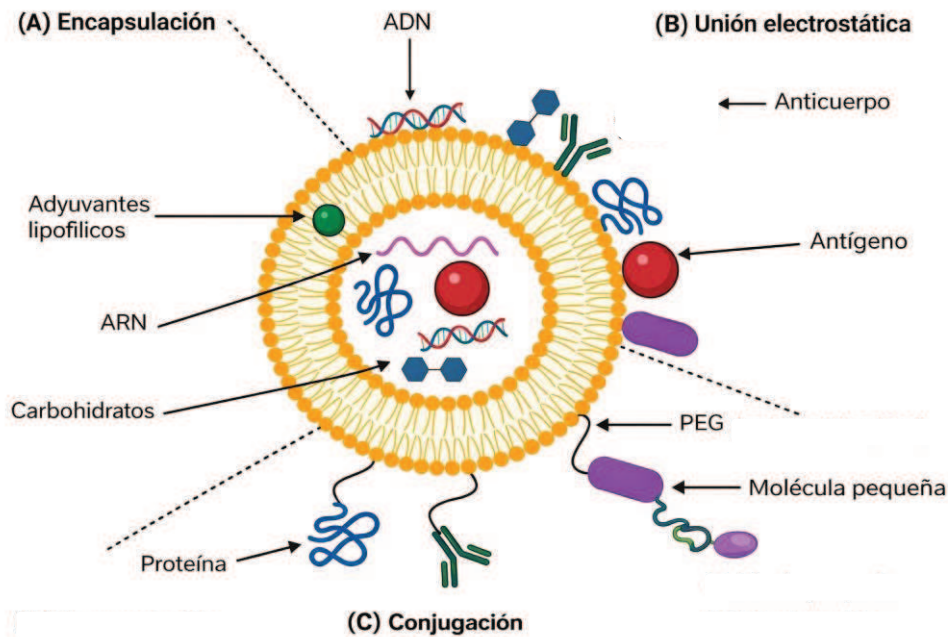


Figura 3. Estrategias de funcionalización de plataformas liposomales. Imagen adaptada de Chatzikleanthous et al., 2021.

En función de estas capacidades, los liposomas han sido ampliamente estudiados como sistemas de co-formulación con inmunoestimulantes o inmunopotenciadores específicos (Chatzikleanthous et al., 2021; Tandrup Schmidt et al., 2016). Estos inmunoestimulantes, también llamados potenciadores inmunitarios, son moléculas capaces de activar receptores del sistema inmune innato, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (RRP). Entre ellos se incluyen los receptores tipo Toll (TLR), tipo NOD (NLR), tipo RIG-I (RLR) y de lectina tipo C (CLR), entre otros. Dichos receptores, ubicados en la superficie celular (como los TLR1, 2, 4, 5, 6 y las CLR), en el endosoma (como los TLR3, 7, 8, 9) o en el citosol (como las NLR y RLR) de las CPAs, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). A través de diversas vías de señalización, su activación desencadena cambios tanto cuantitativos como cualitativos en las funciones inmunológicas (Chatzikleanthous et al., 2021; Tandrup Schmidt et al., 2016).

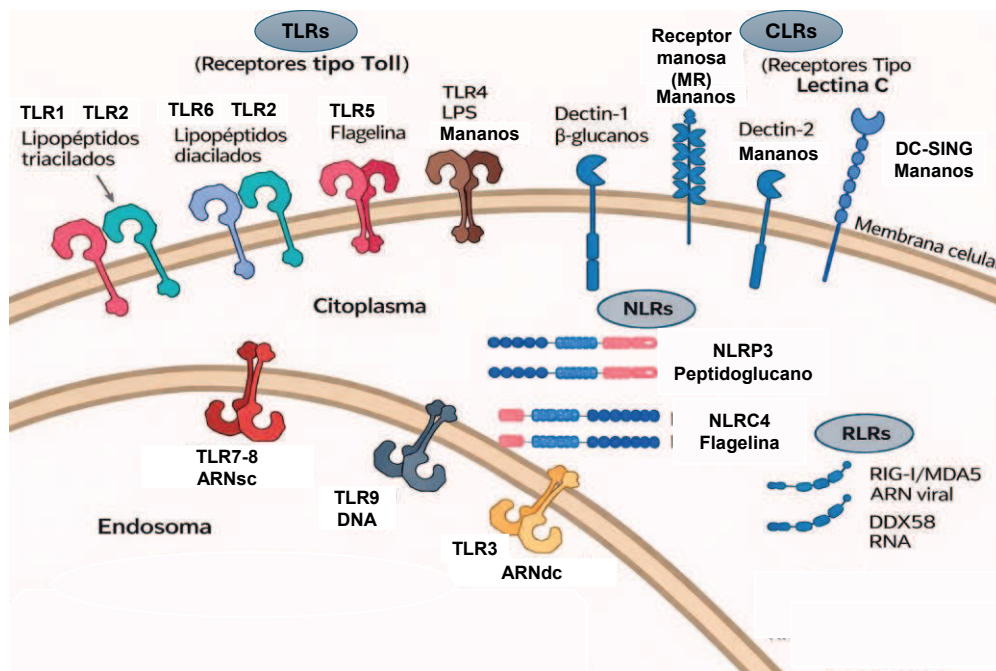


Figura 4. Representación de receptores de reconocimiento de patrones y sus correspondientes ligandos. Imagen adaptada de Chatzikleanthous et al., 2021.

La activación de las CPA a través de estos receptores desencadena una cascada de señalización que define la naturaleza y polarización de la respuesta adaptativa. Este proceso induce la maduración de las CPA, caracterizada por la regulación positiva de moléculas coestimuladoras esenciales (CD40, CD80 y CD86) y la secreción de un perfil específico de citoquinas y quimiocinas (Tandrup Schmidt et al., 2016; Petkar et al., 2021). La co-entrega sincronizada de antígenos y adyuvantes en estas plataformas asegura que la señal de peligro se procese simultáneamente con el mensaje antigénico, optimizando la potencia y memoria inmunitaria final (Schmidt et al., 2016). Dependiendo del entorno de citocinas generado, se activan subpoblaciones específicas de linfocitos T colaboradores (CD4⁺): el perfil Th1 (vía IL-12 e IFN- γ), el Th2 (vía IL-4), el Th17 (vía IL-6 y TGF β) y el perfil Treg (vía TGF β). Más allá de la respuesta colaboradora, el diseño de vacunas modernas aprovecha la presentación cruzada, un mecanismo fundamental que permite a antígenos exógenos acceder a la vía del MHC clase I para activar linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) (Zachova et al., 2016; Rao et al., 2018).

Entre los inmunoestimulantes más estudiados destacan los CpG-ODN (oligodesoxinucleótidos con motivos citosina-guanina no metilados), diversos lipopéptidos sintéticos, mananos, entre otros. Estos han demostrado un alto potencial para modular la respuesta inmune de manera dirigida y eficiente, aunque actúan mediante mecanismos distintos (Bayyurt et al., 2017; Abhyankar et al., 2018; Lai et al., 2018).

A continuación, se describen sus características inmunológicas, mecanismos de acción y aplicaciones.

CpG-ODN: Los CpG-ODN son secuencias sintéticas que imitan el ADN bacteriano y actúan como potentes inmunoestimulantes a través de la activación del TLR9, presente principalmente en células dendríticas (CDS) y macrófagos. Su reconocimiento por TLR9 desencadena cascadas de señalización intracelulares que culminan en la producción de citocinas proinflamatorias e interferones tipo I, así como en la maduración de las CPAs, promoviendo respuestas inmunes robustas, especialmente de tipo Th1. Estas propiedades han llevado a que los CpG-ODN se incorporen ampliamente en formulaciones vacunales para mejorar la inmunogenicidad de antígenos proteicos y peptídicos, particularmente en vacunas frente a bacterias, virus y algunos parásitos (Krieg et al., 2006; Bode et al., 2011).

La actividad de los CpG-ODN puede optimizarse mediante modificaciones químicas, como la incorporación de enlaces fosforotioato (PS), que aumentan su resistencia a la degradación por DNasas y prolongan su vida media en el organismo. De acuerdo con su estructura y perfil inmunológico, los CpG-ODN se clasifican en cuatro clases principales. El CpG-ODN clase A (o clase D) se caracteriza por presentar motivos CpG palindrómicos en el centro de la secuencia unidos por enlaces fosfodiéster (PO) y secuencias poli(G) con enlaces PS en los extremos 3' y 5'. Esta organización le confiere la capacidad de formar estructuras multímeras altamente ordenadas, lo que potencia su acción sobre las células dendríticas plasmocitoides (pDCs) para inducir una intensa producción de IFN tipo 1, activación de células NK y secreción de IFN- γ . Sin embargo, es un inductor débil de proliferación de células B. El CpG-ODN clase B (o clase K) presenta un esqueleto totalmente modificado con enlaces PS y variable número de motivos CpG. A diferencia de la clase A, no forma estructuras multiméricas, pero estimula de manera potente la proliferación y activación de linfocitos B, aunque con escasa inducción de IFN tipo I a través de pDCs. El CpG-ODN clase C combina características de las clases A y B, ya que incluye motivos CpG en una cadena con enlaces PO en el extremo 5' y una secuencia palindrómica con enlaces PS en el extremo 3'. Gracias a ello, estimula tanto la proliferación de linfocitos B como la producción de IFN-I, integrando respuestas humorales e innatas. Finalmente, el CpG-ODN clase P, menos estudiado, contiene dos motivos palindrómicos en un esqueleto con enlaces PO. Este diseño le confiere una elevada capacidad de inducir IFN-I y una fuerte activación del factor de transcripción NF- κ B, promoviendo así una robusta producción de citoquinas inflamatorias (Mena et al., 2003; Mutwiri et al., 2004; Vedelago et al., 2025).

El oligonucleótido utilizado en este trabajo contiene la secuencia del CpG-ODN 2007. Este, es un CpG de clase B, que fue sintetizado con enlaces PS para aumentar su estabilidad frente a la degradación por nucleasas. Esta modificación estructural no solo mejora la estabilidad y su captación celular, sino que también influye de manera significativa su interacción con el receptor TLR9. En el caso del ADN con esqueleto PO natural, la activación de TLR9 puede producirse una vez que la molécula es internalizada en el endosoma, incluso en ausencia de motivos CpG lo

que pone en evidencia el impacto de la estructura nativa del ADN. En contraste, los ODN con enlaces PS dependen estrictamente de la presencia de estos motivos para inducir señalización. En ausencia de secuencias CpG, los ODN con enlaces PS pueden incluso actuar como antagonistas competitivos de TLR9 y TLR7. Además, los ODN con enlaces PS presentan una afinidad marcadamente mayor por TLR9 y una mayor potencia estimuladora en comparación con sus contrapartes de fosfodiéster, lo que explica su eficacia para inducir respuestas celulares y humorales en bovinos (Haas et al., 2008).

El uso de esta secuencia en bovinos ha sido ampliamente documentado, demostrando su capacidad tanto de potenciar la respuesta inmune humoral frente a antígenos vacunales como de inducir respuestas celulares, ya sea utilizando enlaces PS (Wedlock et al., 2005; Mulongo et al., 2013) o enlaces PO (Reidel et al., 2019).

Lipopéptidos: Los surfactantes aminoacídicos (SAA) son lipopéptidos biocompatibles y biodegradables que poseen características inmunológicas relevantes, lo que les confiere aplicaciones importantes en el diseño de vacunas y terapias antiinflamatorias (Eftaiha et al., 2012; Das et al., 2022). A su vez actúan como potentes inmunomoduladores, capaces de estimular la producción de anticuerpos, modular la inflamación y, en algunos casos, ejercer efectos antimicrobianos. La actividad inmunoestimulante de los lipopéptidos podría relacionarse con la interacción con receptores de tipo TLR2, que son capaces de reconocer diacil-lipopéptidos (TLR2/6) y triacil-lipopéptidos (TLR 1/2) (Chatzikleantous et al., 2021).

Dentro de esta familia, los lipopeptidos de tipo Gemini se distinguen por su particular estructura: son lipopéptidos compuestos por dos subunidades (cabeza de aminoácidos y cadena hidrófoba) unidas por una cadena espaciadora. Esta estructura Gemini proporciona un rendimiento superior al de sus contrapartes monoméricas, lo que los convierte en agentes atractivos para el *delivery* controlado de fármacos, facilitado por su capacidad para interactuar con membranas fosfolípídicas y ácidos biliares (Pinheiro et al., 2017; Dominguez-Arca et al., 2022).

En función de estas propiedades, en este trabajo se propuso utilizar un lipopéptido tipo Gemini, denominado AG2C16 el cual fue diseñado y sintetizado por el Laboratorio de Química Aplicada (LaQuimAp, FBCB-UNL), caracterizado por ser un lipopéptido de bajo peso molecular. La región polar consiste en 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). La presencia de la cisteína permite la unión de dos monómeros a través de un puente disulfuro generando la estructura dimérica del Gemini.

Mananos: Los mananos derivados de *Saccharomyces cerevisiae* son polímeros de manosa presentes en la pared celular de estos microorganismos y tienen la capacidad de actuar como potentes inmunoestimulantes al ser reconocidos como PAMPs por las células del sistema inmune

innato. Su principal molécula blanco son los RRP, especialmente los de la familia de lectinas tipo C (CLRs) que incluyen el receptor de manosa (MR/CD206), DC-SIGN, dectina 1 y dectina 2, presentes en las CPAs, CD y macrófagos, lo que se traduce en una regulación positiva de moléculas coestimuladoras clave como CD40, CD80, CD83 y CD86, fundamentales para la activación de linfocitos T y en la polarización hacia un perfil de respuesta Th1, esencial para combatir patógenos intracelulares y tumores (Li et al., 2013; Bartheldyová et al., 2018; Goswami et al., 2021; Nahar et al., 2022). El modo de acción de los mananos se fundamenta en la optimización del procesamiento y la presentación antigénica tras un reconocimiento celular específico. Este proceso comienza con la unión dependiente de Ca^{2+} de los residuos de manosa a los dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs 4-8) del receptor de manosa (MR), siendo el CRD-4 el dominio con mayor afinidad para la unión inicial. Una vez formado el complejo ligando-receptor, este se internaliza rápidamente mediante endocitosis mediada por receptor o fagocitosis hacia el compartimento endosomal. La posterior acidificación del endosoma provoca un cambio conformacional en el receptor que facilita la liberación del ligando, permitiendo que el MR sea reciclado hacia la superficie celular. Finalmente, el antígeno es procesado y presentado a través de las moléculas del MHC clase II para activar linfocitos T CD4+, o mediante la vía de presentación cruzada (MHC clase I) para inducir una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8+. Esta capacidad de presentación dual consolida a los mananos como adyuvantes claves para potenciar la inmunogenicidad en vacunas (Gupta et al., 2022; Nahar et al., 2022).

Nuestro grupo de trabajo desarrolló un adyuvante basado en liposomas catiónicos, compuestos por dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol y estearilamina, que fue evaluado previamente en ratones empleando un antígeno modelo (Reidel et al., 2017). La evaluación de este adyuvante en terneras, utilizando como antígeno modelo moléculas recombinantes de ClfA y FnbpA de *S. aureus*, demostró que los liposomas combinados con CpG-ODN 2007 fueron capaces de inducir la producción de altos títulos de anticuerpos, generando producción de IgG2 y memoria inmunológica (Reidel et al., 2019).

Posteriormente, se desarrollaron distintas variantes de las formulaciones liposomales que incorporaron como inmunoestimulantes el lipopéptido Gemini AG2C16, el CpG-ODN 1826 con enlaces PO específico para ratón, un oligosacárido de manosa hidrofobizado, O-palmitoilmanano (OPM), evaluados en modelo murino tanto individualmente como en combinación (Reidel et al., 2024). Estas formulaciones utilizaron como antígeno modelo a la proteína recombinante ClfA (rClfA) de *S. aureus*. En todos los casos, se observó una respuesta inmune humoral robusta, con la inducción de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c, e IgG2c en la cepa C57BL/6, lo que sugiere activación tanto de respuestas Th2 como Th1. En cuanto a la inmunidad celular, se detectó producción de citoquinas características de los perfiles Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-

4) y Th17 (IL-17A), aunque con distintas intensidades según la formulación empleada. Particularmente, la formulación que combinó liposomas con AG2C16, CpG-ODN y rClfA resultó ser la más eficaz, ya que promovió simultáneamente una respuesta mixta Th1/Th2/Th17 y además activó linfocitos T citotóxicos (Tc) productores de IFN- γ .

Estos resultados reflejan la capacidad del sistema para generar una inmunidad adaptativa amplia, tanto humoral como celular, lo que podría resultar ventajoso frente a infecciones recurrentes por *S. aureus*, donde se requiere tantos mecanismos extracelulares como neutralización, opsonización y posterior fagocitosis como eliminación intracelular del patógeno. Sin embargo, el desempeño de estas nuevas formulaciones adyuvantes en modelo bovino no ha sido aún explorado.

Considerando la relevancia de las infecciones por *S. aureus* en el ganado lechero, el desarrollo creciente de vacunas de subunidades y la falta de estudios exhaustivos sobre la incorporación de nuevos adyuvantes en vacunas para bovinos, en el presente capítulo se propuso analizar el perfil de respuesta inmune inducido por una mezcla de antígenos recombinantes de *S. aureus*, formulados con liposomas catiónicos que contienen diferentes combinaciones de AG2C16, CpG-ODN específico bovino y mananos de *S. cerevisiae*, en vaquillonas lecheras.

OBJETIVOS

Objetivo general: Evaluar el perfil de respuesta inmune inducido por antígenos recombinantes de *S. aureus* formulados con liposomas catiónicos que contienen diferentes combinaciones de inmunoestimulantes en vaquillonas lecheras.

Objetivos específicos:

- 1- Obtener y optimizar la expresión de los antígenos recombinantes α -toxina (rAt), β -toxina (rBt), *Clumping Factor A* (rClfA) y Proteína de unión a Fibronectina (rFnbpA) de *Staphylococcus aureus*.
- 2- Obtener formulaciones adyuvantes compuestas por liposomas catiónicos cargados con diferentes combinaciones de AG2C16, CpG-ODN específico bovino y mananos de *S. cerevisiae*.
- 3- Desarrollar vacunas experimentales compuestas por los antígenos recombinantes rAt, rBt, rClfA, FnbpA de *S. aureus*, formuladas con cada uno de los sistemas adyuvantes obtenidos.
- 4- Caracterizar la respuesta inmune inducida por cada formulación vacunal en vaquillonas lecheras.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Optimización de los antígenos recombinantes

1.1. Obtención de las secuencias codificantes

Las secuencias codificantes de las proteínas rAt, rBt, rClfA y rFnbpA de *Staphylococcus aureus* fueron amplificadas mediante PCR utilizando como molde construcciones en pET32a (Novagen, Virginia, EE.UU.) conteniendo las secuencias correspondientes, disponibles en el laboratorio (Número de acceso GenBank; At: MZ398129; Bt: KC242859; ClfA: KJ001294; FnbpA: KJ001293) (Camussone et al., 2014b; Camussone et al., 2022). Para la amplificación, se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando el software SnapGene (Insightful Science; disponible en snapgene.com versión 1.1.3). Los oligonucleótidos fueron sintetizados de manera comercial (Genbiotech SRL, Buenos Aires, Argentina). El detalle de sus secuencias, temperatura de hibridación y los productos esperados, se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación de genes que codifican los antígenos de interés. Las secuencias en minúsculas corresponden a sitios de reconocimiento de enzimas de restricción utilizados para el clonado en los vectores seleccionados. La tabla también incluye las temperaturas de anillado ($T^{\circ}a$) y el tamaño esperado del producto de PCR expresado en pares de bases (pb).

Antígeno	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Enzima de restricción	$T^{\circ}a$	Tamaño (pb)
rFnbpA	Sentido	catatgGTGGCCAAAATAGCGGTAA	NdeI	58 °C	410
	Antisentido	gtcgacTGGTGGCACGATTGGAGG	SalI		
rClfA	Sentido	catatgGAAAATAGTGTACGCAATC	NdeI	54 °C	1570
	Antisentido	gtcgacCTCTGGAATTGGTTCAATTC	SalI		
rBt	Sentido	catatgGGAGTGATAATGATGGTG	NdeI	54 °C	1012
	Antisentido	gtcgacACTATAGGCTTTGATTGGG	SalI		
rAt	Sentido	gaattcGCAGATTCTGATATTAAT	EcoRI	55 °C	897
	Antisentido	gtcgacATTTGTCAATTCCTTCTTT	SalI		

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un termociclador Ivema T21 (Ivema, Argentina), en un volumen final de 50 μ L. Cada reacción se preparó con la mezcla de reactivos provistos por Productos Bio-Lógicos y se realizó por duplicado: 5 μ L de buffer termofílico 10X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2mM de cada dNTP, 0,3 μ M de cada uno de los

oligonucleótidos sentido y antisentido, 1,25 U de Taq ADN polimerasa y 50 ng de ADN, o agua libre de nucleasas como control negativo. Los programas de ciclado se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Programa de ciclado utilizado en la amplificación mediante PCR.

Antígeno	Numero de ciclos	Temperatura	Tiempo
rFnbpA	1	95 °C	5 min
	30	95 °C	30 seg
		58 °C	30 seg
		72 °C	45 seg
	1	72 °C	5 min
rClfA	1	95 °C	5 min
	30	95 °C	30 seg
		54 °C	30 seg
		72 °C	1.5 min
	1	72 °C	5 min
rAt / rBt	1	95 °C	5 min
	30	95 °C	30 seg
		54 °C	30 seg
		72 °C	1 min
	1	72 °C	5 min

Los productos de amplificación obtenidos se evaluaron en geles al 1% de agarosa teñido con GelRed™ 10.000X (Biotium, Inc), en presencia de un marcador de peso molecular (qL100 pb, Productos Bio-lógicos). Posteriormente, una vez identificadas las bandas de interés, se purificaron los fragmentos utilizando un kit comercial (Gel and PCR Clean Up Sistem - Promega), según instrucciones del fabricante.

1.2. Clonado molecular

1.2.1. Cepas y vectores plasmídicos

Las características de las cepas de *Escherichia coli* y de los vectores plasmídicos empleados para el clonado y expresión de las proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo se describen en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en las técnicas de clonado molecular y expresión de las proteínas recombinantes.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen®
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Novagen®

Tabla 4. Vectores plasmídicos utilizados para el clonado de los fragmentos codificantes.

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T Easy	3018 pb, resistencia a Ampicilina, promotor T7, linealizado, extremos 3' con agregado de T. Este vector fue utilizado para el subclonado de productos de PCR en la cepa <i>E. coli</i> DH5 α .	Promega, EE.UU.
pET-24a	5306 pb, resistencia a Kanamicina, promotor T7 <i>lac</i> . Permite la expresión de proteínas recombinantes con una secuencia de unión N-terminal T7 Tag® y una His Tag® opcional en el C-terminal, además de incluir un sitio de clivaje de enterocinasa (EK) y un origen de replicación fl para producción de ADN de cadena sencilla.	Novagen®
pET-TEV	5975 pb, resistencia a Kanamicina, promotor T7. Produce proteínas recombinantes fusionadas a una His Tag® en el C-terminal y contiene un sitio de clivaje de proteasa TEV, además de un origen de replicación fl. Este vector se utiliza como sistema de expresión en cepas de <i>E. coli</i> , como BL21(DE3), permitiendo la purificación de proteínas por afinidad y posterior escisión específica mediante TEV proteasa.	Novagen®
pET-28c	5367 pb, resistencia a Kanamicina, promotor T7. Permite la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a His Tag® en el N-terminal, seguida de un sitio de clivaje de trombina, y opcionalmente un His Tag® en el C-terminal. Además, incluye un sitio T7 Tag® para facilitar la detección y purificación de la proteína expresada.	Novagen®

1.2.2. Clonado

Las secuencias codificantes para los cuatro antígenos de interés obtenidos por PCR (sección 1.1) se ligaron al vector pGEM-TEasy (Promega), de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, las construcciones obtenidas se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α (sección 1.2.1), las cuales fueron plaqueadas en medio LB (Luria-

Bertani) suplementado con 0,1 mg/mL de ampicilina, 16 μ L isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (50 mg/mL) y 40 μ L X-gal (20 mg/mL) por placa, para permitir la selección de clones mediante el sistema de complementación α de la β -galactosidasa. En estas condiciones, las colonias transformadas con construcciones recombinantes se diferenciaron por su coloración, observándose colonias blancas (inserto presente) y azules (sin inserto). Se seleccionaron y repicaron 5 colonias blancas para cada una de las construcciones, las cuales fueron sometidas a PCR de colonia, en las mismas condiciones que para la amplificación inicial (Tabla 2), con el fin de verificar la presencia de los fragmentos de interés. Los clones identificados como positivos fueron seleccionados para la extracción de ADN plasmídico utilizando el procedimiento de minipreparación de plásmidos (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems, Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tanto las construcciones obtenidas (pGEM-TEasy + Inserto) como los plásmidos destino (pET-24a, pET-TEV, pET-28c) se sometieron a digestión con las enzimas de restricción correspondientes (Tabla 1). Para ello, se prepararon mezclas de reacción que contenían 1 μ g de ADN, 3 U de cada enzima y el buffer 1X recomendado por el fabricante, complementado con BSA 0,1 mg/mL, en un volumen final de 20 μ L (Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron durante 90 minutos a 37 °C, tras lo cual los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™. De los geles se aislaron y purificaron tanto el fragmento liberado (correspondiente a la secuencia codificante de los antígenos), como los plásmidos destino linealizados, utilizando un kit comercial de purificación de ADN (Gel and PCR Clean Up System, Promega).

Para la reacción de ligación, el fragmento purificado se mezcló con los correspondientes vectores, en una relación molar inserto:vector de 3:1. A la mezcla se le adicionaron 1 μ L de buffer 10X T4 DNA Ligase y 2 U de T4 DNA Ligase (Thermo Scientific), completando con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 10 μ L. La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 4 °C y posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Las construcciones obtenidas fueron finalmente utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Cinco colonias seleccionadas al azar para cada una de las construcciones fueron sometidas a PCR de colonia (Tabla 2). A los clones identificados como positivos se les realizó una extracción de ADN plasmídico (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems, Promega).

1.2.3. Transformación bacteriana (método MOPS/CaCl₂)

La transformación de las cepas de *E. coli* DH5 α o BL21(DE3), según corresponda (clonado o expresión, respectivamente), se llevó a cabo utilizando el protocolo de células químicamente competentes basado en soluciones tampón de MOPS y CaCl₂. Brevemente, un cultivo de cada

cepa, crecido previamente en medio LB durante toda la noche (ON) a 37 °C en agitación, fue replicado en medio LB y cultivado a 37 °C en agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana ($DO_{600} < 0.6$). Se enfrió 1 ml de cada cultivo en hielo durante 5 minutos. Las células se cosecharon luego por centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm e incubaron con 500 uL de la solución ST1 en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm, se descartó el sobrenadante, se suspendió el pellet celular en 500 μ l de ST2, y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 4000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 uL de ST2. A dicha suspensión se le adicionó el plásmido o el producto de ligación correspondiente, y se incubó en hielo durante 60 minutos. Finalmente se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos, seguido de una incubación en hielo por 2 minutos. Las células transformadas se recuperaron en 1 ml de medio SOC bajo agitación suave a 37°C por 1 hora. Las bacterias se concentraron mediante centrifugación y se sembraron en placas de agar LB suplementadas con el antibiótico selectivo correspondiente, incubándose a 37 °C durante la noche.

Para la expresión de rBt se implementó además la co-transformación con sistemas de chaperonas bacterianas utilizando el kit comercial Chaperone Plasmid Set (Takara Bio Inc.), que incluye cinco plásmidos: pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 y pTf16, cada uno diseñado para expresar conjuntos distintos de chaperonas cooperativas. Para ello, cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformados con cada uno de los plásmidos del kit, siguiendo los pasos descritos anteriormente, y empleando la resistencia a cloranfenicol como marcador selectivo. Posteriormente, cada clon obtenido fue co-transformado con la construcción obtenida para rBt, según lo indicado previamente. Las co-transformaciones se seleccionaron en placas de LB-agar suplementadas con cloranfenicol y kanamicina.

1.3. Obtención de los antígenos recombinantes

1.3.1. Estandarización de expresión de los antígenos recombinantes

Se realizó una puesta a punto de las condiciones de expresión para cada antígeno, evaluando distintos factores experimentales (Tabla 5). Entre ellos, se incluyó el uso de diferentes agentes inductores, como IPTG o lactosa, en diferentes concentraciones. Se empleó el medio de cultivo estándar LB y se evaluaron diferentes temperaturas de inducción. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la concentración de antibiótico de selección (kanamicina) sobre el crecimiento celular y los niveles de expresión. Estos ensayos se realizaron para todas las construcciones transformadas en BL21 (DE3) y se llevaron a cabo en formato de placas multipocillo, lo que

permitió el análisis comparativo de múltiples condiciones en paralelo (Correa & Opezzo, 2011; Correa et al., 2014).

Tabla 5: Condiciones de Inducción evaluadas para la expresión de los antígenos de interés en *E. coli* BL21 (DE3).

Inductor	Concentración inductor	Condiciones de incubación	Antibiótico
IPTG	1 mM / 0,5 mM	3 horas – 37 °C ON – 20 °C	10 µg/ml
	1 mM / 0,5 mM	3 horas – 37 °C ON – 20 °C	50 µg/ml
Lactosa	5mM / 10mM / 15 mM	3 horas – 37 °C ON – 20 °C	10 µg/ml
	5mM / 10mM / 15 mM	3 horas – 37 °C ON – 20 °C	50 µg/ml

1.3.2. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes

Para la producción de los antígenos rAt, rClfA y rFnbpA la inducción se realizó en un volumen de cultivo mayor, siguiendo lo establecido en la sección 1.3.1.

Brevemente, células de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo las distintas construcciones plasmídicas obtenidas se cultivaron durante toda la noche en agitación a 37 °C en 5 mL de medio líquido LB suplementado con kanamicina. Estos cultivos se diluyeron 1/100 en erlermeyers de 1 litro conteniendo 100 mL de medio LB suplementado con kanamicina en la concentración establecida y se incubaron a 37 °C con agitación a 220 rpm hasta alcanzar una DO600 de 0,7–0,8. Una vez alcanzados estos niveles de DO, se procedió a inducir la expresión mediante la adición de lactosa o IPTG a las concentraciones establecidas. Los cultivos se mantuvieron en incubación a la temperatura y tiempo establecidos, bajo agitación constante a 220 rpm.

Para el caso de rBt, se trabajó con los clones obtenidos de las co-transformaciones y, en primer lugar, se realizó la inducción de las chaperonas. Para ello, cultivos de las cepas transformadas con cada uno de los vectores (sección 1.2.1) se cultivaron durante toda la noche a 37 °C y 220 rpm en 5 mL de medio líquido LB suplementado con 20 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL de kanamicina. Estos cultivos se diluyeron 1/100 en erlermeyers de 1 litro conteniendo 100 mL de medio LB suplementado con las mismas concentraciones de antibiótico y se cultivaron a 37 °C a 220 rpm hasta una DO600 de 0,4–0,6. Para los plásmidos bajo control del promotor *araB* (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pTf16) se añadió L-arabinosa a una concentración final de 2 mg/mL, mientras que para pG-Tf2, regulado por el promotor Pzt-1 (tet), se utilizó tetraciclina a una

concentración final de 5 ng/mL. Posteriormente, los cultivos se dejaron crecer hasta DO600 de 0,7–0,8 y se procedió a la inducción de la rBt mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Finalmente, los cultivos se incubaron durante toda la noche a 20 °C con agitación constante a 220 rpm.

1.3.3. Purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA, Thermo Scientific) bajo condiciones nativas. Para ello, luego de la inducción, los cultivos de *E.coli* obtenidos en la sección 1.3.2 se centrifugaron y el pellet celular se resuspendió en Buffer A y lisó por prensado en EmulsiFlex® (Modelo B15 – Avestin, Canadá). El lisado celular obtenido se centrifugó durante 30 min a 12000 g, se separó el sobrenadante y se filtró utilizando filtros de 0,22 µm (Millex®, Merck Millipore) para eliminar posibles agregados o precipitados. La purificación de las proteínas se realizó aplicando el sistema IDA-Sepharosa (Novagen, U.S.A), el cual consiste en una columna sobre la cual se inmoviliza Ni²⁺. Se utilizó una columna de 1 mL, la cual inicialmente se equilibró con 5 volúmenes de Buffer A y luego se cargó con el sobrenadante obtenido con las proteínas recombinantes, recirculándolo 2 veces. Posteriormente se lavó con 5 volúmenes de Buffer A. La elución de las proteínas de interés se realizó con 5 volúmenes de cada una de las soluciones de elución de concentración creciente de imidazol SE 1, 2, 3 y 4 (Anexo I). La pureza de las fracciones obtenidas fue evaluada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con SDS (SDS-PAGE) (MiniPROTEAN II, BioRad®) en condiciones desnaturalizantes, seguida de tinción con azul brillante de Coomassie (Laemmli 1970). Se utilizaron los marcadores de peso molecular de proteínas (BLUelf Prestained Protein Ladder (3.5–245 kDa, Genbiotech SRL)). La concentración de las proteínas en cada fracción fue determinada mediante espectrofotometría a 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

1.3.4. Evaluación de actividad hemolítica de las toxinas recombinantes e inactivación.

Las toxinas recombinantes rAT y rBT fueron sometidas a distintos tratamientos de inactivación y la ausencia de actividad hemolítica luego del tratamiento fue confirmada frente a eritrocitos bovinos. Se evaluaron tres condiciones de inactivación: (1) incubación a 60 °C durante 30 minutos, (2) tratamiento con formol 0.1% (v/v), y (3) combinación de calor a 60 °C por 15 minutos seguido de formol 0.025 % (v/v).

La evaluación de actividad se realizó en placas de 96 pocillos, en las cuales se colocaron 100 µL de las proteínas tratadas diluidas 1:5 en PBS y diluciones seriadas de las mismas 1:2. Posteriormente, se adicionó igual volumen de una suspensión de eritrocitos bovinos diluidos al

1% en PBS y se incubó a 37 °C durante 1 hora, seguido de una incubación ON entre 4-8 °C. La hemólisis fue evaluada visualmente. Como control positivo se utilizó cada proteína sin tratar y como control negativo un pocillo sin proteína. Se registró la dilución de toxina a la cual se deja de observar hemólisis de GR (Wadström & Möllby, 1971).

2. *Obtención de formulaciones adyuvantes*

2.1. *Preparación de liposomas e inmunoestimulantes*

Los liposomas catiónicos (Lip) se prepararon mediante el método de inyección etanólica (Reidel et al., 2019), utilizando dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC; Avanti Polar Lipids), colesterol y estearilamina (Sigma-Aldrich) en una proporción molar 7:2:2. Brevemente, los componentes lipídicos se disolvieron en una mezcla 1:1 v/v de etanol e isopropanol (fase orgánica), la cual fue inyectada a una fase acuosa compuesta por tampón acetato de sodio 50 mM pH 4,3 en proporción 1:9 v/v, obteniéndose una suspensión liposomal con una concentración final lipídica de 16 mM. (Wagner et al., 2006; Yang et al., 2012). Como IS se emplearon Oligonucleótido CpG específico para bovinos (CpG-ODN 2007): 5'-tcgtcgtttgcgttttgcgtt-3', con enlaces fosfodiéster (Genbiotech SRL; Mulongo et al., 2013); Lipopéptido gemini AG2C16: sintetizado por el grupo de investigación del Departamento de Química Orgánica, FBCB-UNL; Mananos comerciales obtenidos de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich).

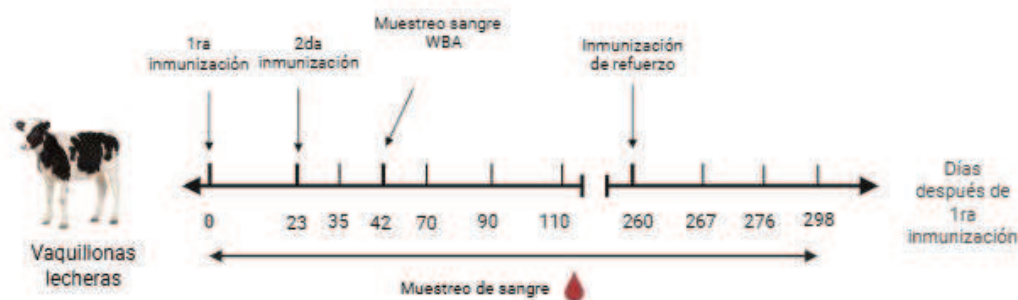
2.2. *Formulación y caracterización de inmunógenos.*

Se formularon inmunógenos multicomponentes combinando los cuatro antígenos recombinantes obtenidos: rFnbpA, rClfA, rBt y rAt (Rec), liposomas y diferentes combinaciones de IS. Las formulaciones obtenidas fueron las siguientes: Lip + CpG-ODN + Rec; Lip + AG2-C16 + Rec; Lip + AG2C16 + CpG-ODN + Rec; Lip + Man + Rec; Lip + AG2-C16 + CpG-ODN, Lip + Man. La concentración final de cada componente fue: Lip 4 mM, CpG-ODN 7,5 nmol/mL, AG2C16 400 µM, Man 2 mg/mL y Rec 100 µg/dosis cada antígeno. Las formulaciones se incubaron a 4°C durante 72 h con monitoreo periódico de su estabilidad (observación de precipitados o grumos). Una dilución de cada formulación fue analizada, 24 hs después de su preparación, mediante DLS (*Dynamic Light Scattering*) con el objetivo de determinar el tamaño predominante (diámetro hidrodinámico, D), así como la dispersión de tamaño de los liposomas en suspensión (índice de polidispersidad, IPD) (Yang et al., 2012). Los valores de IPD inferiores a 0.5 se asocian con tamaños de partícula uniformes (Stetefeld et al., 2016). Los resultados de la distribución de tamaños se obtuvieron promediando 3 mediciones consecutivas, cada una compuesta por 14

corridas de 15 segundos. Estas determinaciones se realizaron utilizando el quipo Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK).

3. Caracterización de la respuesta inmune inducida por las formulaciones

3.1. Animales y esquema de inmunización



Descripción del estudio.

Se utilizaron 65 vaquillonas Holstein, de entre 8 y 10 meses de edad, pertenecientes al rodeo lechero de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela (Santa Fe, Argentina). Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en siete grupos experimentales. Los grupos vacunados estuvieron conformados por: G1, Lip + CpG-ODN + Rec (n = 7); G2, Lip + AG2C16 + Rec (n = 7); G3, Lip + CpG-ODN + AG2C16 + Rec (n = 12); y G4, Lip + Man + Rec (n = 15). Los grupos control fueron: C1, sin tratamiento (n = 12); C2, Lip + CpG-ODN + AG2C16 (n = 7), utilizado como control vehicular para los grupos G1, G2 y G3; y C3, Lip + Man (n = 5), utilizado como control vehicular para el grupo G4. Se administraron dos dosis subcutáneas (2 mL/dosis) en la región cervical, en la tabla del cuello, a los días 0 y 21. A los 8 meses del inicio, se aplicó una dosis de refuerzo a 53 de los animales; 12 animales no gestantes fueron transferidos a otro rodeo y dejaron de estar disponibles para continuar el estudio.

Se realizaron extracciones de sangre por punción de la vena coccígea aproximadamente cada 15 días desde el día 0 (primera dosis) hasta el día 120, y durante 45 días posteriores al refuerzo. Las muestras fueron procesadas para la obtención de suero, el cual se almacenó a -20°C hasta su utilización (3.2.1). Veintiún días después de la segunda dosis de la vacuna o del control, se obtuvieron muestras de sangre heparinizada mediante punción de la vena yugular para la determinación de la producción de citoquinas (3.2.2). Éstas muestras se utilizaron dentro de las 4 horas posteriores a la recolección.

Los animales fueron monitoreados para detectar reacciones adversas después de cada inmunización.

3.2. Evaluación de la respuesta inmune

3.2.1. Respuesta humoral

La respuesta inmune humoral generada frente a los antígenos recombinantes rFnbpA, rClfA, rAt y rBt, se evaluó mediante ensayos de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos séricos específicos IgG, IgG1 e IgG2, de acuerdo con la metodología descrita por Reidel et al., (2019), con algunas adaptaciones para el presente trabajo. Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), las cuales fueron sensibilizadas con 0,5 µg de cada proteína por pocillo, disueltas en una solución tampón de carbonato de sodio (pH 9,6), e incubando las placas durante 2 horas a 37 °C. Luego se procedió al bloqueo de los sitios no específicos mediante la incubación con una solución al 5% p/v de leche descremada en polvo de cabra en PBS (pH 7,4). Posteriormente, se incubó con los sueros de los animales inmunizados o controles, previamente diluidos en una solución al 1% p/v de la misma leche en PBS. Para la detección de los anticuerpos unidos, se utilizaron anticuerpos específicos: anti-IgG bovina (Sigma-Aldrich) y anti-IgG1 bovina (BioRad Laboratories, CA, USA), ambos conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP), y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG2 bovina (Sigma-Aldrich), seguido por un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón también conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Inc., EE.UU.). Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C por 1 hora, con lavados intermedios utilizando una solución de PBS con Tween 20 al 0,05%, repetidos tres veces luego de cada paso para eliminar residuos no específicos. Para la revelación del ensayo, se agregó el sustrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB; Thermo Scientific) en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), lo que generó una reacción colorimétrica proporcional a la cantidad de anticuerpo unido. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 0,5 N. Finalmente, la lectura de la DO se realizó a 450 nm en un lector de placas (modelo Infinite F50, Tecan Trading AG, Suiza). Los resultados obtenidos se expresaron como valores de DO o como títulos, según correspondiera.

3.2.2. Respuesta celular

La determinación de la producción de citoquinas se realizó mediante un ensayo de sangre total con estímulo antigénico específico (Whole Blood Assay, WBA), según lo descrito por Rainard et al., (2015). Para ello, se dispusieron 1,5 mL de sangre completa obtenida a los 21 días post segunda dosis por pocillo en placas de cultivo celular de 24 pocillos (Biologix Group Ltd.), a las cuales se agregaron 500 µL de una de las siguientes condiciones: medio RPMI-1640 sin aditivos como control negativo; medio RPMI-1640 suplementado con 10 µg/pocillo de mitógeno de pokeweed (PWM) como estímulo policlonal no específico; o medio RPMI-1640 suplementado con 25 µg/pocillo de cada uno de los antígenos recombinantes rClfA o rFnbpA como estímulos

específicos. Cada condición fue ensayada por duplicado para cada animal. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Al finalizar el período de incubación, los sobrenadantes de cada pocillo fueron cuidadosamente recolectados, centrifugados si presentaban células en suspensión, y almacenados a -80 °C hasta su análisis. La cuantificación de las citoquinas interferón gamma (IFN- γ), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 17 (IL-17) en los sobrenadantes se realizó mediante ensayos de ELISA utilizando kits comerciales específicos para bovinos (MABtech AB, NackaStrand, Suecia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones se determinaron en función de curvas estándar generadas con citoquinas recombinantes provistas en los kits, y los resultados fueron expresados en pg/mL.

4. Análisis estadístico

Para mediciones repetidas a lo largo del tiempo, se aplicó la prueba de Friedman para comparar los cuatro grupos inmunizados con el control no inmunizado, así como para comparar los tres grupos inmunizados que contenían CpG-ODN o AG2C16 en su formulación con su respectivo control vehículo (Lip+CpG-ODN+AG2C16). La prueba de Wilcoxon se utilizó para comparar el grupo Lip+Man+Rec con su correspondiente control vehículo (Lip+Man). Las diferencias estadísticas entre grupos G1, G2 y G3 con C2 en puntos de tiempo específicos se analizaron utilizando la prueba de Kruskal–Wallis, seguida de la corrección de Dunn para comparaciones múltiples. Se utilizó la prueba de Mann–Whitney para comparar el grupo Lip+Man+Rec con su correspondiente control vehicular (Lip+Man). Los resultados se presentan como mediana \pm rango intercuartil (RI) para cada grupo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

5. Consideraciones éticas

Todos los procedimientos fueron consistentes con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Agropecuarios en Investigación y Enseñanza Agrícola (FASS 2010) y fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad del Centro Regional Santa Fe del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (CICUAE, N.º 21-0120; 6 de junio de 2021) y por el Comité de Ética y Seguridad en la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (CE2021-35; 16 de marzo de 2021).

RESULTADOS

1. Obtención de antígenos recombinantes.

1.1. Clonado molecular

Se obtuvieron los insertos amplificados por PCR correspondientes a los cuatro antígenos propuestos. El tamaño aproximado de cada inserto fue: FnbpA: 410 pb / ClfA: 1570 pb / At: 980 pb / Bt: 1012 pb. Luego de las reacciones de corte enzimático y ligación se lograron obtener las siguientes construcciones plasmídicas para cada uno de los 4 antígenos recombinantes propuestos.

- FnbpA-pET24a / FnbpA-pET28c / FnbpA-pET-TEV
- ClfA-pET28c / ClfA-pET-TEV
- At-pET24a / At-pET-TEV
- Bt-pET24a / Bt-pET28c / Bt-pET-TEV.

Con las construcciones obtenidas se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3). A su vez, para rBt, se obtuvieron co-transformaciones en BL21 (DE3) entre la construcción Bt-pET28c y los 5 plásmidos de expresión de chaperonas adicionales (Materiales y Métodos, 1.3.2).

1.2. Expresión de recombinantes

Para la producción de las proteínas recombinantes, se realizó inicialmente una puesta a punto de las condiciones de expresión, con los clones obtenidos para cada antígeno en la cepa *E. coli* BL21 (DE3). Para ello, se evaluaron distintos agentes inductores (lactosa e IPTG), diversas temperaturas de expresión y variaciones en la concentración del antibiótico de selección. Tras la lisis de los cultivos inducidos, las fracciones de pellet y sobrenadante se analizaron mediante SDS-PAGE, comparándose visualmente los rendimientos relativos de proteína obtenidos en cada condición.

En la expresión de las cuatro proteínas recombinantes, bajo las condiciones de inducción previamente descritas, se observó variabilidad en los niveles de expresión según el antígeno considerado. Enfocándonos sobre la variable antibióticos, se pudo observar que, la disminución en la concentración de antibiótico no tuvo un efecto negativo en la expresión, manteniéndose esta tendencia para los cuatro antígenos.

Con respecto a los inductores y la temperatura de inducción, para rFnbpA y rClfA la condición de 1 mM de IPTG e incubación por 3 horas a 37 °C fue la óptima, en cambio para rAT y rBT, el rendimiento óptimo se vio bajo la condición de 0,5 mM IPTG incubado ON a 20 °C. Bajo estas condiciones las proteínas rFnbpA, rClfA y rAT se lograron obtener de forma soluble, en el sobrenadante luego de la ruptura celular, mientras que la mayor proporción de rBT se obtuvo de forma insoluble en el pellet celular, formando cuerpos de inclusión.

Con el objetivo de mejorar la solubilidad de rBt, se evaluaron co-transformaciones en BL21 (DE3) con un set de plásmidos que codifican chaperonas, capaces de favorecer la expresión recombinante de las proteínas en forma soluble. Para ello, clones de Bt-pET28c en *E. coli* BL21 (DE3) se co-transformaron con 5 plásmidos comerciales codificantes de chaperonas. La producción soluble de rBt se logró utilizando la construcción PGro7, que codifica las chaperonas groES-groEL, bajo las siguientes condiciones: rBt-pET28c-PGro7, utilizando como inductores 2 mg/ml L-arabinosa para las chaperonas y 0,5 mM de IPTG para rBT, incubándolos a una temperatura de 20 °C, ON.

Luego de esta serie de evaluaciones, se pudo establecer las condiciones finales para la expresión de los cuatro antígenos:

- **rFnbpA**: Cepa BL21 (DE3), Inductor IPTG 1 mM, Kanamicina 0,2 mM, incubación 37 °C – 3 horas, agitación 220 rpm, plásmido pET-24a.
- **rClfA**: Cepa BL21 (DE3), Inductor IPTG 1 mM, Kanamicina 0,2 mM, incubación 37 °C – 3 horas, agitación 220 rpm, plásmido pET-TEV.
- **rAT**: Cepa BL21 (DE3), Inductor IPTG 0.5 mM, Kanamicina 0,2 mM, incubación 20 °C – ON, agitación 220 rpm, plásmido pET-24a.
- **rBT**: Cepa BL21 (DE3), Inductor IPTG 0,5 mM, Cloranfenicol 0,2 mM, Kanamicina 0,2 mM, incubación 20 °C – ON, agitación 220 rpm, plásmido pET-28c/PGro7. Inductor chaperonas 2 mg/ml L-arabinosa.

Se realizó la expresión de las cuatro proteínas bajo las condiciones de inducción establecidas, en un volumen de cultivo 100 ml de medio LB para su posterior purificación por columna de afinidad a Ni-NTA. En la Figura 5 se presentan los resultados del análisis por SDS-PAGE conteniendo las proteínas purificadas. La proteína rClfA presentó un peso molecular aproximado de 50 kDa, rFnbpA un peso molecular de 19 kDa, rAt de 36 kDa y rBT de 35 kDa lo cual confirma la correcta expresión y purificación de los 4 antígenos propuestos. Adicionalmente, la presencia de bandas de menor intensidad en algunos carriles sugiere la existencia de trazas de proteínas contaminantes o productos de degradación. En general, los resultados evidencian que la estrategia de purificación empleada permitió obtener las proteínas de interés con un buen grado de enriquecimiento y en las siguientes concentraciones: para rFnbpA, rClfA y rBt los rendimientos fueron de 30 mg/L de cultivo, mientras que para rAt el rendimiento fue de 55 mg/L de cultivo.

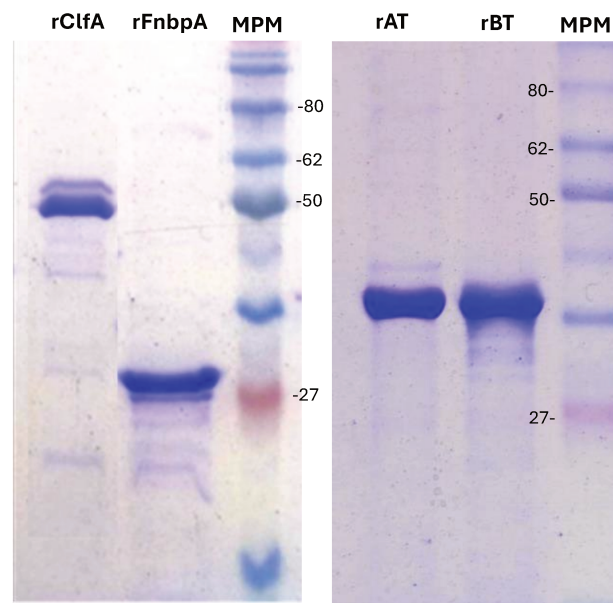


Figura 5. Análisis de los antígenos recombinantes obtenidos mediante expresión en *E. coli* y purificación por cromatografía en columna Ni-NTA. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. Calles: 1) rClfA; 2) rFnbpA; 3) MPM (marcador de peso molecular); 4) rBt; 5) rAt; 6) MPM (marcador de peso molecular)

1.3. Actividad hemolítica de las toxinas recombinantes (rAt y rBt)

Se evaluó la actividad hemolítica de las toxinas rAt y rBt obtenidas frente a GR bovinos. Para ello, se partió de una dilución 1/5 de toxina purificada, correspondiente a 0,24 mg/ml para rAt y 0,14 mg/ml para rBt, seguida por diluciones seriadas al medio en placas de 96 pocillos. Luego de las incubaciones correspondientes con GR bovinos, se observó una actividad hemolítica marcada para ambas toxinas, con un título de hemólisis de 1/40, definido como la mayor dilución a la cual la toxina mantiene actividad hemolítica (Figura 6).

Debido a que ambas toxinas recombinantes (rAt y rBt) poseen actividad hemolítica, antes de ser utilizadas como antígenos vacunales se procedió a inactivarlas a fines de evitar tanto su acción sobre los liposomas que forman parte de la formulación como problemas de toxicidad. En la Figura 6 se muestran los resultados correspondientes a las distintas condiciones de inactivación ensayadas. Para ambas toxinas, el tratamiento térmico a 60 °C durante 30 minutos (condición 2) redujo parcialmente la actividad hemolítica, evidenciándose hemólisis leve en las primeras diluciones. Por el contrario, Tanto el tratamiento con formol al 0,1% v/v (condición 3) como la combinación de tratamiento térmico a 60 °C durante 15 minutos seguido de incubación con formol 0,025% v/v (condición 4) resultaron en la supresión total de la actividad hemolítica, sin presencia de hemólisis visible en ninguna de las diluciones ensayadas.

La condición 4 fue seleccionada para la inactivación de las toxinas previo a la formulación de los inmunógenos.

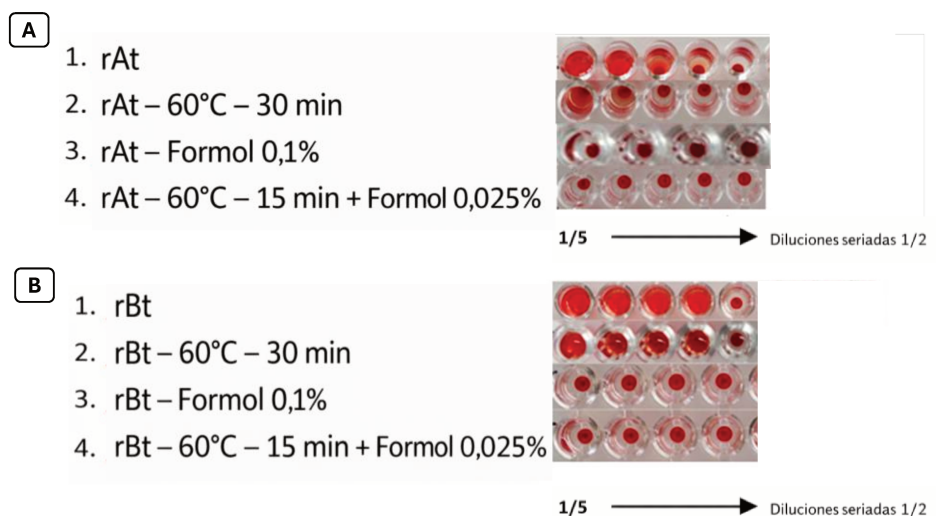


Figura 6. Evaluación de la actividad hemolítica de las toxinas recombinantes rAT y rBT frente a eritrocitos bovinos bajo diferentes condiciones de tratamiento.

2. Caracterización de formulaciones

Una vez obtenidos los antígenos de interés, se procedió a la preparación de las diferentes formulaciones liposomales propuestas para este estudio. El análisis del tamaño de partícula y el IPD de las distintas formulaciones liposomales se llevó a cabo mediante DLS con el objetivo de evaluar su estabilidad coloidal y homogeneidad, parámetros críticos en formulaciones para liberación de antígenos. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Los liposomas vacíos presentaron un D de 201,2 nm, lo cual se encuentra dentro del rango esperado para vesículas lipídicas de pequeño tamaño. Además, mostraron un IPD bajo, (menor a 0,5) indicando una distribución de tamaños homogénea. El D de los liposomas vacíos se vio aumentado luego de la adición de los otros componentes. En particular, la incorporación de CpG-ODN produjo un aumento considerable, tanto en el D (de 201,2 nm a 741,1 nm, un aumento de 3,7 veces) como en la dispersidad de las partículas (valores de IPD de 0.224 a 0.325, un aumento del 45%). Los histogramas de distribución de tamaño por intensidad para esta formulación muestran un patrón multimodal, observándose picos en tamaños pequeños (200-300 nm) pero también señales de alta intensidad asociadas a poblaciones de gran tamaño (>1000 nm), indicando la presencia de agregados voluminosos y una distribución muy heterogénea evidenciada por el alto IPD registrado. Un comportamiento similar y aún más marcado, se observó con la adición de los antígenos recombinantes a esta formulación. En contraste, la incorporación de AG2C16 o Man (en Lip+AG2C16 y Lip+AG2C16+Rec, o Lip+Man y Lip+Man+Rec, respectivamente) resultó

en un ligero aumento del D de partícula (254,8 nm, 221,8 nm, 207,8 nm y 211,5 nm, respectivamente), en comparación con los liposomas vacíos, con pocos cambios en la homogeneidad de las partículas (valores de IPD de 0.385, 0.263, 0.311 y 0.233, respectivamente). A su vez, la adición de AG2-C16 a las mezclas que contenían CpG-ODN (Lip+CpG-ODN+AG2C16 y Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec) pareció estabilizar las formulaciones, generando una menor dispersidad (valores de IPD de 0.297 y 0.379, respectivamente) y un diámetro menor (266.6 nm y 225.6 nm, respectivamente), en comparación con las formulaciones que contienen solo CpG-ODN (741,1 nm, IPD = 0,325 para Lip+CpG-ODN y 1741 nm, IPD = 0,638 para Lip+CpG-ODN+Rec). La incorporación de Rec tuvo un efecto mínimo en el tamaño de partícula de los liposomas suplementados con AG2C16 y Man (221,8 nm y 211,5 nm, respectivamente).

Tabla 6. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad (IPD) de las formulaciones liposomales determinadas por Dispersión Dinámica de Luz (DLS). Referencias: D: diámetro hidrodinámico (media de tres mediciones).

Formulaciones Liposomales	D (nm)±SD	IPD
Liposomas	201.2±52,64	0.224
Lip + CpG-ODN	741.1± 246.2	0.325
Lip + CpG-ODN + Rec	1741± 283.9	0.638
Lip + AG2C16	254.8 ± 94.47	0.385
Lip + AG2C16 + Rec	221.8± 59.15	0.263
Lip + CpG-ODN +AG2C16	266.6± 84.62	0.297
Lip + CpG-ODN + AG2C16 + Rec	225.6± 58.92	0.379
Lip + Man	207.8± 51.03	0.311
Lip + Man + Rec	211.5 ± 50.47	0.233

3. Evaluación de la Respuesta inmune

3.1. Respuesta inmune humoral

3.1.1. Detección de IgG específicas frente a antígenos recombinantes en suero

Con el objetivo de evaluar la respuesta humoral inducida por las distintas formulaciones vacunales, se analizaron los niveles séricos de anticuerpos IgG específicos frente a los cuatro antígenos recombinantes utilizados (rClfA, rFnbpA, rAt y rBt) a lo largo del ensayo. Para ello, se realizaron determinaciones mediante ELISA de las muestras de suero obtenidas en distintos puntos temporales.

Las comparaciones a lo largo del tiempo se realizaron utilizando las pruebas de Friedman o Wilcoxon, según correspondiera. Se observaron aumentos en los niveles de IgG a lo largo del

tiempo en todos los grupos inmunizados (Figura 7). En comparación con el control sin inmunizar (C1), el Lip+CpG-ODN+Rec mostró niveles de IgG significativamente más altos para los cuatro antígenos recombinantes, mientras que Lip+AG2C16+Rec presentó incrementos significativos para rAt ($p < 0.05$) y rBt ($p < 0.05$), Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec para rAt ($p < 0.001$) y rClfA ($p < 0.01$), y Lip+Man+Rec para rAt ($p < 0.001$), rBt ($p < 0.05$) y rClfA ($p < 0.05$). Al compararse con los controles vehículo, los grupos inmunizados también mostraron niveles significativamente mayores, con algunas excepciones. En relación con Lip+CpG-ODN+AG2C16, el grupo Lip+CpG-ODN+Rec presentó incrementos significativos para rAt ($p < 0.05$), rClfA ($p < 0.05$) y rFnbpA ($p < 0.01$); el grupo Lip+AG2C16+Rec mostró diferencias significativas para rAt ($p < 0.05$), rBt ($p < 0.05$); mientras que el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec mostró incrementos significativos para rAt ($p < 0.01$) y rClfA ($p < 0.01$). En comparación con Lip+Man, Lip+Man+Rec mostró diferencias significativas para todos los antígenos ($p < 0.01$). No se observaron diferencias significativas en los niveles de IgG para los cuatro antígenos entre las distintas formulaciones vacunales a lo largo del ensayo ($p > 0.12$).

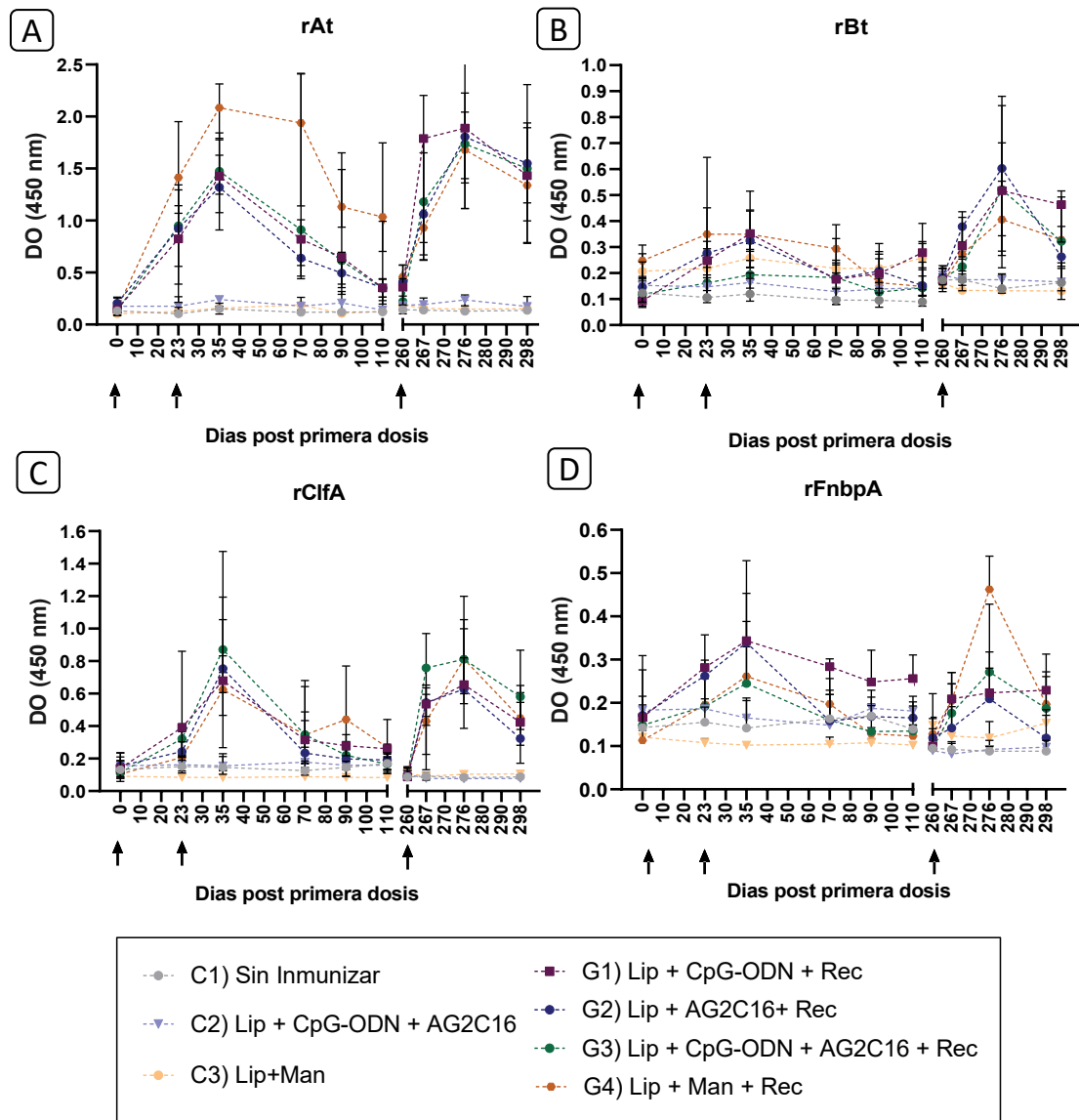


Figura 7. Niveles específicos de IgG en suero de vaquillonas inmunizadas con diferentes formulaciones que contienen cuatro antígenos recombinantes (A: anti-rAt, B: anti-rBt, C: anti-rCIfA, D: anti-rFnbpA), medidos mediante ELISA indirecto. El esquema de inmunización consistió en dos dosis y un refuerzo. Los sueros fueron diluidos 1/1000. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm. Los datos se presentan como mediana \pm rango intercuartil (RI) para cada grupo. Las flechas indican los días de vacunación.

Las diferencias estadísticas entre grupos en puntos de tiempo específicos se analizaron utilizando la prueba de Kruskal–Wallis, seguida de la corrección de Dunn para comparaciones múltiples, o test de Mann–Whitney, según corresponda. Este análisis demostró que luego de la administración de dos dosis de vacuna, se observó un aumento en los niveles de IgG específicas en grupos inmunizados, en comparación con los grupos control, los cuales alcanzaron su pico hacia el día 35 posterior al inicio del ensayo (Figura 7). Al día 35, los 4 grupos inmunizados presentaron niveles de IgG significativamente superiores tanto respecto del control sin inmunizar, como de los controles de vehículo (Lip+CpG-ODN+AG2C16 y Lip+Man) para todos los antígenos, a

excepción del grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec que no presentó niveles significativos frente rFnbpA (Tabla 7A). Se administró una dosis de refuerzo aproximadamente ocho meses después de la primera inmunización (día 260). Tras esta nueva aplicación, se registró un nuevo ascenso en los títulos de IgG específicas en los grupos vacunados, que comenzó a evidenciarse a los siete días post-refuerzo y alcanzó su máximo alrededor del día 276. En dicho momento, los grupos inmunizados mostraron incrementos significativos de los niveles de IgG en comparación con el control no inmunizado para los cuatro antígenos recombinantes (Tabla 7B). Comparados con los controles de vehículos, todos los grupos evidenciaron incrementos significativos en este punto frente a los cuatro antígenos a excepción de los grupos Lip+CpG-ODN+Rec y Lip+AG2C16+Rec frente a rFnbpA. Las comparaciones estadísticas completas para cada punto temporal se presentan en la Tabla 7A y 7B.

Durante todo el período de análisis, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgG entre las distintas formulaciones vacunales (rAt, rBt y rClfA ($p > 0,99$) y rFnbpA ($p > 0,11$)).

Cabe destacar que no se observaron niveles detectables de IgG específica en los sueros obtenidos antes de la inmunización (suero pre-inmune). Asimismo, no se observaron reacciones adversas ni signos clínicos asociados a la aplicación de las vacunas en ninguno de los grupos experimentales.

Tabla 7. Niveles de IgG específica en suero de vaquillonas inmunizadas con diferentes formulaciones que contienen cuatro antígenos recombinantes (rAt, rBt, rClfA, rFnbpA), medidos mediante ELISA indirecto. El esquema de inmunización consistió en dos dosis y un refuerzo. Los sueros se diluyeron 1:1000. Se realizó un análisis estadístico de Kruskal-Wallis para comparar diferencias entre grupos, seguido de la corrección de Dunn para comparaciones múltiples. Se muestra la mediana de los sueros de animales de cada grupo. Referencias: Letras diferentes indican diferencias significativas entre: a: comparado con el control no inmunizado, b: comparado con Lip+CpG-ODN+AG2-C16, y c: comparado con el control Lip+Man. ns: no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Tabla 7A Dias	Lip+CpG-ODN+Rec				Lip+AG2C16+Rec				Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec				Lip+Man+Rec			
	rAT	rBT	rClfA	rFnbpA	rAT	rBT	rClfA	rFnbpA	rAT	rBT	rClfA	rFnbpA	rAT	rBT	rClfA	rFnbpA
0	0.140 ^{ns}	0.098 ^{ns}	0.141 ^{ns}	0.166 ^{ns}	0.206 ^{ns}	0.146 ^{ns}	0.156 ^{ns}	0.171 ^{ns}	0.136 ^{ns}	0.118 ^{ns}	0.114 ^{ns}	0.148 ^{ns}	0.154 ^{ns}	0.247 ^{ns}	0.105 ^{ns}	0.113 ^{ns}
23	0.823 ^{*a}	0.248 ^{ns}	0.391 ^{**ab}	0.282 ^{**a}	0.923 ^{*a}	0.277 ^{*a}	0.243 ^{*a}	0.262 ^{*a}	0.949 ^{**a}	0.162 ^{ns}	0.321 ^{**ab}	0.191 ^{ns}	1.413 ^{****a,c}	0.349 ^{****a*c}	0.207 ^{***c}	0.195 ^{ns**c}
35	1.427 ^{**ab}	0.352 ^{****a**b}	0.680 ^{*ab}	0.344 ^{**ab}	1.320 ^{**ab}	0.325 ^{****a**b}	0.754 ^{****a**b}	0.339 ^{**ab}	1.475 ^{****ab}	0.193 ^{*a}	0.871 ^{***a,b}	0.244 ^{ns}	2.085 ^{****a,c}	0.350 ^{**a*c}	0.625 ^{**a,c}	0.260 ^{**a***c}
70	0.820 ^{**ab}	0.176 ^{ns}	0.315 ^{*ab}	0.284 ^{ns}	0.638 ^{*ab}	0.179 ^{ns}	0.234 ^{ns}	0.158 ^{ns}	0.912 ^{****a***b}	0.183 ^{*a}	0.347 ^{****a**b}	0.159 ^{ns}	1.938 ^{****a,c}	0.294 ^{****a*c}	0.346 ^{**a,c}	0.197 ^{ns**c}
90	0.647 ^{ns}	0.198 ^{ns}	0.279 ^{*a}	0.248 ^{ns}	0.495 ^{*ab}	0.208 ^{*a}	0.198 ^{ns}	0.168 ^{ns}	0.613 ^{****a**b}	0.127 ^{ns}	0.221 ^{*a}	0.133 ^{ns}	1.132 ^{****a,c}	0.218 ^{ns}	0.441 ^{***a,c}	0.128 ^{ns}
110	0.353 ^{*a}	0.279 ^{ns}	0.261 ^{ns}	0.256 ^{ns}	0.354 ^{*a}	0.152 ^{ns}	0.191 ^{ns}	0.165 ^{ns}	0.348 ^{**a*b}	0.142 ^{ns}	0.165 ^{ns}	0.134 ^{ns}	1.035 ^{****a,c}	0.149 ^{ns}	0.269 ^{ns***c}	0.123 ^{ns}

Tabla 7B Dias	Lip+CpG-ODN+Rec				Lip+AG2C16+Rec				Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec				Lip+Man+Rec			
	rAT	rBT	rClfA	rFnbpA	rAT	rBT	rClfA	rFnbpA	rAT	rBT	rClfA	rFnbpA	rAT	rBT	rClfA	rFnbpA
260	0.360 ^{ns}	0.174 ^{ns}	0.087 ^{ns}	0.100 ^{ns}	0.410 ^{*a}	0.183 ^{ns}	0.088 ^{ns}	0.119 ^{ns}	0.222 ^{ns}	0.179 ^{ns}	0.094 ^{ns}	0.095 ^{ns}	0.459 ^{****a*c}	0.163 ^{ns}	0.130 ^{ns}	0.128 ^{ns}
267	1.789 ^{**ab}	0.305 ^{*a}	0.535 ^{*a}	0.209 ^{ns}	1.061 ^{**ab}	0.379 ^{**a}	0.544 ^{*a}	0.142 ^{ns}	1.181 ^{***a*b}	0.225 ^{*a}	0.757 ^{****a**b}	0.176 ^{**a*b}	0.930 ^{*a,c}	0.273 ^{*a**c}	0.430 ^{ns}	0.205 ^{**a,c}
276	1.889 ^{**ab}	0.517 ^{**ab}	0.655 ^{*ab}	0.223 ^{*a}	1.806 ^{**ab}	0.603 ^{**ab}	0.628 ^{*ab}	0.209 ^{*a}	1.737 ^{****a*b}	0.521 ^{****ab}	0.811 ^{****a**b}	0.271 ^{****a**b}	1.680 ^{**a,c}	0.406 ^{**a,c}	0.813 ^{***a,c}	0.462 ^{***a*c}
298	1.432 ^{**a}	0.464 ^{**a,b}	0.424 ^{*a}	0.229 ^{**a,b}	1.549 ^{**a}	0.263 ^{ns}	0.324 ^{ns}	0.119 ^{ns}	1,501 ^{*a}	0.322 ^{**a*b}	0.580 ^{****a**b}	0.187 ^{**a*b}	1.339 ^{****a}	0.328 ^{*a***c}	0.448 ^{**a,c}	0.196 ^{**a,c}

3.1.2. Títulos de IgG específicos

Los títulos de IgG fueron evaluados en los puntos temporales correspondientes a la respuesta máxima observada en el análisis de cinética, tanto luego del esquema inicial de inmunización (día 35), como tras la administración del refuerzo (día 276) (Figura 8). Al día 35, todos los grupos inmunizados mostraron un aumento significativo en los títulos de IgG específica frente a los cuatro antígenos recombinantes en comparación con el grupo control no inmunizado con valores de p que oscilaron entre ($p < 0.05 - p < 0.0001$). Además, los grupos Lip+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec presentaron títulos significativamente más elevados en comparación con sus respectivos controles de vehículo para los cuatro antígenos evaluados ($p < 0.05 - p < 0.0001$) (Figura 8A). En el grupo Lip+CpG-ODN+Rec las significancias se observaron para rAt ($p < 0.05$), rClfA ($p < 0.05$) y rFnbpA ($p < 0.01$) mientras que en Lip+ODN-CpG+AG2-C16+Rec la significancia se detectó únicamente para rAt ($p < 0.01$) y rClfA ($p < 0.01$).

La evaluación realizada a los 15 días posteriores a la dosis de refuerzo (día 276) (Figura 8B) evidenció que todas las formulaciones fueron capaces de estimular la producción de IgG específicas. Se observaron títulos significativamente más altos en Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec en comparación con el control no inmunizado, para los cuatro antígenos. Por su parte el grupo Lip+AG2-C16+Rec reveló aumentos significativos para rAt ($p < 0.01$), rBt ($p < 0.05$) y rClfA ($p < 0.05$), mientras que en Lip+CpG-ODN+Rec lo fue solo para rAt ($p < 0.001$) y rClfA ($p < 0.05$). Con respecto al control de vehículo, el grupo Lip+Man+Rec mostró la respuesta más amplia, induciendo títulos de anticuerpos significativos frente a todos los antígenos ($p < 0,05$). Los grupos Lip+AG2C16+Rec y Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec generaron títulos significativos de IgG frente a rAt y rClfA, mientras que Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec respondió adicionalmente frente a rBt. Por su parte el grupo Lip+CpG-ODN+Rec solo evidenció títulos significativos frente a rAT ($p < 0.01$).

No se observaron diferencias significativas en los títulos de IgG específica para un mismo antígeno entre los distintos grupos inmunizados, en ninguno de los dos momentos evaluados.

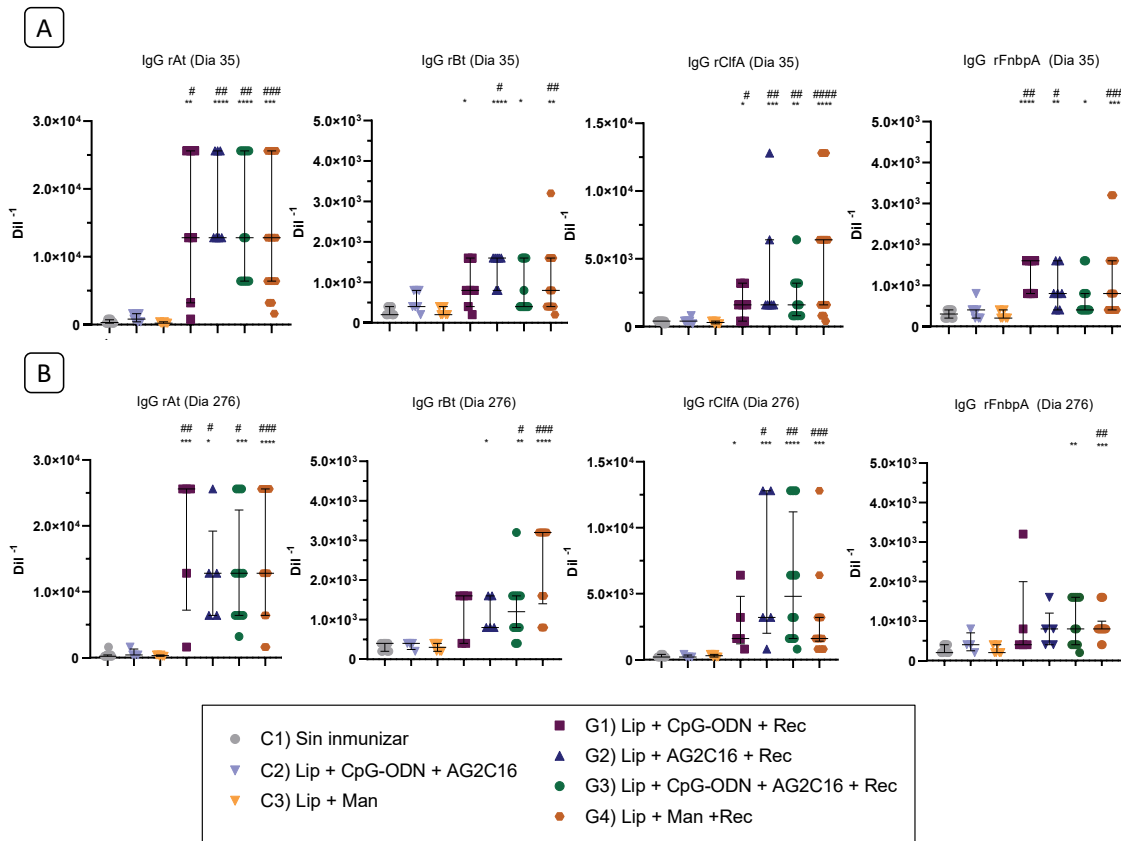


Figura 8. *Titulos de anticuerpos IgG contra rAt, rBt, rClfA y rFnbpA en suero de vaquillonas en el día 35 (A) y día 276 (B). Los sueros fueron diluidos en serie desde 1:200 hasta 1:25600. El valor de corte se calculó como el promedio más tres desviaciones estándar de la densidad óptica (DO) obtenida a partir de los sueros preinmunes de tres animales sin inmunizar, utilizados como controles negativos. Los datos se presentan como mediana ± rango intercuartil (RI). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. control no inmunizado; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ vs. control vehicular (C2 para G1, G2, G3 y C3 para G4).*

3.1.3. Cuantificación de anticuerpos IgG1 e IgG2 específicos frente a antígenos recombinantes

Con el objetivo de caracterizar más profundamente el perfil de respuesta humoral inducido por las formulaciones vacunales, se analizaron los niveles séricos de las subclases IgG1 e IgG2 específicas para los cuatro antígenos recombinantes incluidos en el estudio. Las determinaciones se realizaron en los momentos de máxima respuesta IgG total observada previamente en el análisis cinético, es decir, en el día 35 (tras el esquema inicial de dos dosis) y en el día 276 (15 días posteriores al refuerzo) (Figura 9).

Tras dos dosis, todas las formulaciones experimentales indujeron la producción de anticuerpos IgG1 específicos (Figura 9A). Los grupos Lip+CpG-ODN+Rec y Lip+Man+Rec mostraron incrementos significativos frente a todos los antígenos para ambos controles ($p < 0,05 - p < 0,0001$). El grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec generó incrementos significativos para todos los antígenos respecto al control sin inmunizar ($p < 0,05 - p < 0,001$) y para rAt, rClfA y rFnbpA respecto a su respectivo control de vehículo ($p < 0,05 - p < 0,01$). Por su parte el grupo Lip+AG2C16+Rec indujo respuestas significativas para rAt, rBt y rClfA frente a ambos controles ($p < 0,05 - p < 0,001$).

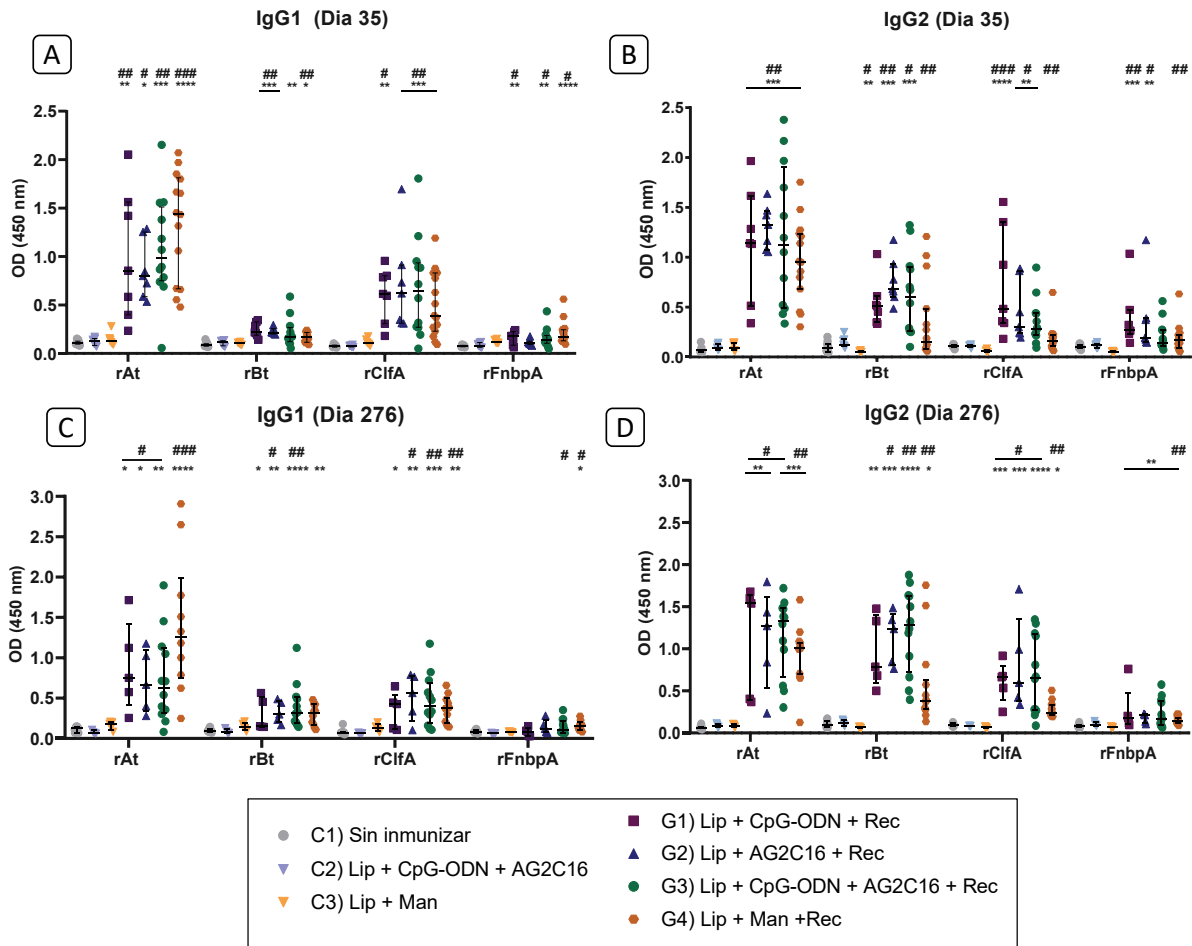
Al día 276 (quince días después de la dosis de refuerzo), las cuatro formulaciones estimularon nuevamente la producción de IgG1 en niveles comparables a los del día 35 (Figura 9C). En este punto, la formulación Lip+Man+Rec mostró diferencias significativas para los cuatro antígenos frente al control sin inmunizar ($p < 0,05 - p < 0,0001$) mientras que en los grupos Lip+CpG-ODN+Rec, Lip+AG2C16+Rec y Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec este aumento se evidenció frente a rAt, rBt y rClfA ($p < 0,05 - p < 0,0001$). Al comparar con sus respectivos controles vehiculares, la formulación Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec mostró aumentos significativos en los niveles de IgG1 frente a todos los antígenos ($p < 0,05 - p < 0,01$), mientras que Lip+CpG-ODN+Rec presentó incrementos significativos sólo para rAt ($p < 0,05$) y Lip+AG2C16+Rec para rAt, rBt y rClfA ($p < 0,05$). Por su parte, la formulación Lip+Man+Rec incrementó significativamente los niveles de IgG1 para rAt, rClfA y rFnbpA en comparación con Lip+Man ($p < 0,05 - p < 0,001$).

En cuanto a los niveles de IgG2 (Figura 9B), tras dos dosis de los inmunógenos, todas las formulaciones indujeron la producción de esta subclase. Los grupos Lip+CpG-ODN+Rec y Lip+AG2C16+Rec generaron niveles de IgG2 significativamente elevados frente a los cuatro antígenos (rAt, rBt, rClfA y rFnbpA) en comparación con ambos controles ($p < 0,05 - p < 0,0001$). El grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec mostró incrementos significativos frente a rAt, rBt y rClfA frente a ambos controles ($p < 0,05 - p < 0,001$), mientras que el grupo Lip+Man+Rec presentó diferencias significativas frente a rAt frente a ambos controles ($p < 0,01$), y contra rBt, rClfA y rFnbpA solo frente a su control de vehículo Lip+Man ($p < 0,01$).

Finalmente, el análisis realizado al día 276 (Figura 9D) evidenció que todas las formulaciones estimularon la producción específica de IgG2 frente a los cuatro antígenos recombinantes, con niveles significativamente mayores en comparación con el grupo no inmunizado ($p < 0,05 - p < 0,0001$). En la comparación con los respectivos controles vehiculares, las formulaciones Lip+AG2C16+Rec y Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec generaron incrementos significativos en los niveles de IgG2 frente a rAt, rBt y rClfA ($p < 0,05 - p < 0,01$). El grupo Lip+CpG-ODN+Rec mostró incrementos significativos únicamente frente a rAt y rClfA ($p < 0,05$), mientras que, la

formulación Lip+Man+Rec incrementó significativamente los niveles de IgG2 frente a todos los antígenos, en comparación con su correspondiente control vehicular.

Los distintos grados de significancia se puede observar en la Figura 9.



3.2. Respuesta inmune celular

3.2.1. Producción de citoquinas

Con el propósito de caracterizar la respuesta inmune celular inducida por las distintas formulaciones vacunales, se cuantificaron los niveles de citoquinas IFN- γ , IL-17, IL-5 e IL-4 en

sobrenadantes de cultivo de sangre total recolectada 21 días después de la segunda dosis de vacunación, estimulada *in vitro* con los antígenos recombinantes rFnbpA y rClfA. En primer lugar, se observó que ambos estímulos antigénicos indujeron un aumento en la producción de IFN- γ en los cuatro grupos inmunizados (Figura 10A). Los grupos Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec presentaron niveles significativamente mayores de IFN- γ tanto frente a rFnbpA como a rClfA, en comparación con el control sin inmunizar ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente) y con sus correspondientes controles vehiculares ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ para rFnbpA; $p < 0,001$ y $p < 0,05$ para rClfA, respectivamente).

En cuanto a la producción de IL-17 (Figura 10B), se observó una alta variabilidad interindividual dentro de los grupos experimentales, incluyendo algunos animales pertenecientes a los grupos control que presentaron niveles detectables de esta citoquina. Si bien se evidenció una tendencia hacia una mayor producción de IL-17 en los grupos inmunizados tras la estimulación antigénica, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística respecto a los controles no inmunizados ni a los vehiculares. Al analizar los niveles absolutos de citoquina, se observaron respuestas biológicas superiores en formulaciones específicas. Ante el estímulo con rClfA, los grupos que presentaron las medianas más elevadas fueron Lip+Man+Rec (169,0 pg/mL), Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec (155,3 pg/mL) y Lip+AG2C16+Rec (134,8 pg/mL). Por su parte, frente al estímulo con rFnbpA, la tendencia fue liderada por el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec (138,6 pg/mL), seguido por Lip+Man+Rec (106,5 pg/mL).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IFN- γ e IL-17 entre los distintos grupos inmunizados.

Por otro lado, no se detectó producción de IL-4 ni IL-5 en ninguno de los grupos experimentales tras la estimulación con rFnbpA ni rClfA.

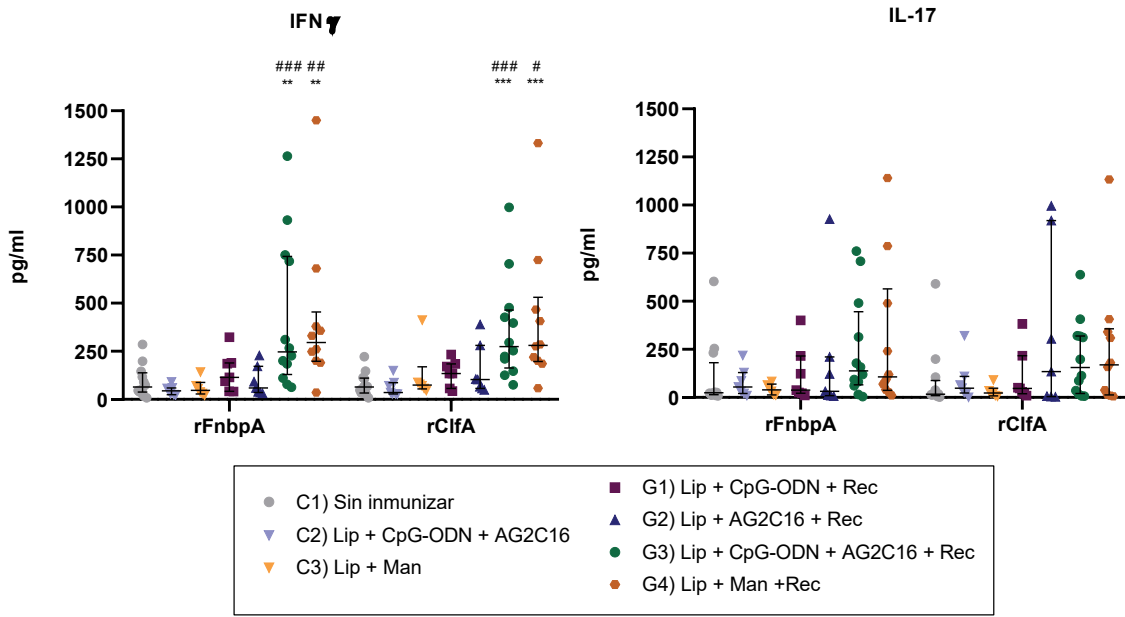


Figura 10. Ensayo de sangre total estimulada con rFnbpA y rClfA. (A) Producción de IFN- γ . (B) Producción de IL-17A. La sangre de las vaquillonas fue recolectada 21 días después de la segunda inmunización y cultivada durante 48 horas en placas de 24 pocillos en presencia de 25 μ g/pocillo de rFnbpA o rClfA. Los resultados se presentan como mediana \pm rango intercuartil (RI). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de comparaciones múltiples de Dunn (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el control no inmunizado. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ en comparación con el control vehicular (C2 para G1, G2, G3 y C3 para G4)).

DISCUSIÓN

Las vacunas a subunidades representan un enfoque prometedor en la inmunización veterinaria, ya que permiten la estandarización del producto, minimizan la manipulación de patógenos y aumentan el perfil de seguridad del inmunógeno. Junto con el diseño del antígeno, el desarrollo de sistemas adyuvantes eficaces representa un desafío fundamental en la vacunología veterinaria moderna.

Desde hace ya un tiempo, nuestro grupo viene trabajando en el desarrollo de nuevas formulaciones liposomales que contienen distintas combinaciones de inmunoestimulantes como ser lipopéptidos tipo Gemini (AG2C16), oligonucleótidos CpG específicos para bovino y mananos de *S. cerevisiae*. En el marco de esta Tesis Doctoral, centrada en el desarrollo de inmunógenos para el control de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus*, se planteó evaluar el potencial de estas formulaciones liposomales como adyuvantes de una mezcla de antígenos recombinantes de *S. aureus* considerados claves en su patogenia de la infección intramamaria. En el presente capítulo se abordó la caracterización de la respuesta inmune inducida por estas formulaciones en vaquillonas lecheras, como un paso necesario para evaluar su comportamiento inmunológico en una especie de interés productivo. Este enfoque permitió generar información experimental en bovinos que se utilizó como base para sustentar la evaluación posterior de estas formulaciones en modelos de desafío intramamario controlado.

En una primera etapa, se realizó el subclonado de los factores de virulencia de *S. aureus* (At, Bt, ClfA y FnbpA) en plásmidos que permiten su expresión sin proteína de fusión y se utilizaron distintas estrategias para obtenerlos de forma soluble y con altos rendimientos. En trabajos previos de nuestro equipo estos antígenos se obtuvieron fusionados a tiorredoxina (TRX). Los anticuerpos generados contra ellos en vaquillonas redujeron significativamente la adhesión bacteriana a fibronectina y fibrinógeno, inhibieron la invasión de células epiteliales mamarias por *S. aureus*, disminuyeron la actividad hemolítica de las toxinas y aumentaron la fagocitosis por neutrófilos, *in vitro* (Camussone et al., 2014b; Pujato et al., 2018; Reidel et al., 2019; Camussone et al., 2022). En sistemas de expresión bacterianos, la proteína de fusión TRX se utiliza habitualmente para favorecer el plegamiento adecuado y aumentar la solubilidad de proteínas recombinantes, especialmente aquellas con tendencia a formar cuerpos de inclusión. Sin embargo, distintos estudios han señalado que la incorporación de TRX puede alterar la conformación nativa de los antígenos, afectando la exposición y accesibilidad de epítomos estructurales relevantes para la inducción de una respuesta inmune eficaz (Lavallie et al., 2000). Asimismo, se ha demostrado

que TRX posee inmunogenicidad intrínseca, lo cual representa un riesgo de desviar la respuesta humoral hacia la proteína de fusión en lugar de dirigirla exclusivamente hacia el antígeno blanco (Tursunov et al., 2022). Considerando estas limitaciones y con el propósito central de evaluar inmunógenos con capacidad de inducir respuestas protectoras frente a antígenos específicos de *S. aureus*, se implementó una estrategia de clonado orientada a obtener proteínas recombinantes libres de etiquetas de fusión que permitieran preservar con mayor fidelidad su estructura conformacional nativa y minimizar interferencias inmunológicas no deseadas.

En cuanto a la expresión de las proteínas recombinantes, para rFnbpA, rClfA y rAt, la optimización de las condiciones de inducción (temperatura, concentración de IPTG y tiempo de cultivo) resultó suficiente para obtener las proteínas de forma soluble y con un adecuado grado de pureza. Sin embargo, rBt mostró una marcada tendencia a formar cuerpos de inclusión en todas las condiciones evaluadas. Este comportamiento puede estar vinculado a las características estructurales y funcionales propias de la rBt de *S. aureus*. Su estructura cristalográfica revela un plegamiento globular complejo, con una combinación de hojas β y α -hélices, e incluye una horquilla β , además de superficies hidrofóbicas expuestas y enlaces disulfuro (Huseby et al., 2007). La formación de cuerpos de inclusión durante la expresión recombinante puede verse favorecida por distintos factores como un alto número de copias del gen de interés, el uso de promotores fuertes y elevadas concentraciones del inductor, así como de las propiedades intrínsecas de la proteína, en particular de su secuencia de aminoácidos, siendo las proteínas con regiones altamente hidrofóbicas las más propensas a agregarse (Singh et al., 2015). Para resolver esta limitación sin comprometer el diseño libre de proteínas de fusión, se implementó la coexpresión con chaperonas GroEL–GroES. Esta estrategia favorece el plegamiento correcto de proteínas recombinantes cuya expresión soluble se ve comprometida, ya que la sobrecarga de los sistemas de plegamiento del hospedador puede promover la agregación. En este contexto, la suplementación con chaperonas como GroEL–GroES contribuye a estabilizar intermediarios conformacionales y a reducir la formación de agregados insolubles, sin necesidad de recurrir a proteínas de fusión (Lin et al., 2006; Correa & Oppezzo, 2011). En el caso de rBt, la coexpresión con GroEL–GroES permitió obtener la proteína de forma soluble, evidenciando la eficacia de este abordaje para superar las limitaciones de expresión asociadas a sus características estructurales.

Las formulaciones vacunales desarrolladas en este trabajo incluyeron los cuatro antígenos recombinantes seleccionados, combinados con liposomas como plataforma de entrega y distintos inmunoestimulantes evaluados tanto de manera individual como en combinaciones específicas. Esta estrategia permitió analizar no solo el efecto de cada adyuvante por separado, sino también su posible sinergia dentro de formulaciones multicomponentes. Para la caracterización de las formulaciones liposomales se aplicó DLS, técnica que permite determinar el diámetro

hidrodinámico de las partículas y su índice de polidispersidad (IPD). Este último constituye un parámetro clave para evaluar la uniformidad en la distribución de tamaños dentro de la muestra, considerándose que valores inferiores a 0,5 reflejan una población de partículas homogénea y, por tanto, una formulación con propiedades físicas estables y adecuadas (Stetefeld et al., 2016). El tamaño de partícula se ha relacionado con la intensidad de la respuesta inmunitaria desencadenada por vacunas formuladas con este tipo de vehículos, siendo las partículas más pequeñas (20–200 nm) las que inducen respuestas más fuertes que las de mayor tamaño (Dobrovolskaia et al., 2016). El perfil Th también puede verse influenciado por el tamaño y la forma de las nanopartículas; se ha observado que las nanopartículas esféricas de aproximadamente 200 nm se asocian con perfiles Th1 y Th2 (Kumar et al., 2015). La inclusión de los distintos inmunoestimulantes evaluados en este estudio afectó de manera diferencial el diámetro hidrodinámico de las partículas liposomales. Tal como habíamos observado previamente (Reidel et al., 2024), en este trabajo la adición de CpG-ODN a los liposomas generó un aumento en el tamaño en comparación con los liposomas vacíos, junto con un incremento en el valor del IPD, lo cual se asoció a una tendencia a la agregación. Este efecto fue más marcado en presencia de antígenos recombinantes. El aumento del IPD, sumado al incremento del diámetro hidrodinámico, podría indicar una interacción entre la bicapa lipídica catiónica de los liposomas y las cargas negativas del CpG-ODN, generando la formación de vesículas multilamelares así como agregados entre partículas (Weisman et al., 2004). Sin embargo, la incorporación de AG2C16 en esta formulación pareció tener un efecto estabilizante, ya que redujo el IPD de la formulación Lip+CpG-ODN+AG2C16 en comparación con Lip+CpG-ODN, tanto con proteínas como sin ellas. Este efecto podría estar asociado a una compensación de cargas debido a la naturaleza catiónica del AG2C16 (Dauty et al., 2001). En cuanto a la incorporación de mananos en liposomas vacíos, se registró un leve aumento en el diámetro hidrodinámico. Este hallazgo sugiere una interacción efectiva entre los mananos y los liposomas, sin evidencia de una tendencia a la formación de precipitados visibles, como fue confirmado por los bajos valores de IPD. Resultados similares fueron reportados en liposomas que contenían colesterol manosilado (Pan Li et al., 2013), donde no se observaron diferencias significativas en el tamaño ni en el potencial zeta entre liposomas con y sin manosa. Además, Goswami et al., (2021) evaluaron la incorporación de conjugados manano-colesterol con distintas longitudes de manano (mono a tetrasacáridos) y observaron que, aunque esta incorporación aumentó tanto el diámetro como el IPD, los valores se mantuvieron por debajo de 0,5, y este efecto se atenuó mediante la adición de PEG en concentraciones entre 0,3% y 2% a las formulaciones.

Se analizó la respuesta inmune, tanto celular como humoral, inducida por las formulaciones en vaquillonas lecheras entre los 8 y 10 meses de edad al comienzo del plan de inmunización. Luego de la aplicación de dos dosis, todas las formulaciones desarrollaron niveles significativamente

más altos de anticuerpos IgG específicos contra los cuatro antígenos vacunales en comparación con los grupos control. Estos resultados sugieren que el esquema de dos dosis fue efectivo para inducir una respuesta humoral robusta, manteniendo niveles elevados de anticuerpos por más de un mes. Estos hallazgos son consistentes con los previamente reportados por nuestro grupo (Reidel et al., 2019), donde se observó que un esquema de dos dosis con una formulación que contenía Lip+CpG-ODN como adyuvante fue suficiente para estimular la producción de anticuerpos específicos en vaquillonas. Asimismo, se evidenció que la inclusión de una tercera dosis en el esquema inicial tuvo un efecto limitado en la estimulación de la respuesta humoral (Reidel et al., 2019). Novoa et al., (2021) demostraron que la inmunización de novillos con dos dosis de una vacuna recombinante formulada con cuatro proteínas de *Neospora caninum* y Lip+CpG-ODN estimuló niveles significativos de anticuerpos IgG específicos contra *N. caninum*, con valores por encima del punto de corte desde el día 21 que se mantuvieron hasta el día 84 tras la primera dosis. Saravanan et al., (2015) evaluaron la eficacia de una vacuna contra la fiebre aftosa formulada con un adyuvante liposomal en emulsión oleosa (VacciMax®) combinado con CpG en terneros de 6 a 12 meses. Los animales fueron inmunizados con una dosis inicial, seguida de un refuerzo a los 6 meses. Los títulos de anticuerpos neutralizantes (VNT) alcanzaron niveles significativos entre los días 14 y 28 post-inmunización, dependiendo del serotipo evaluado. La vacuna proporcionó un 25% de protección un año después de una sola dosis, porcentaje que aumentó al 86% tras la administración del refuerzo, lo que resalta la importancia de implementar esquemas de vacunación con refuerzos para optimizar la eficacia protectora. En el presente estudio, si bien en esta etapa no se evaluó la protección otorgada por las formulaciones, una dosis de refuerzo administrada ocho meses después del inicio del plan de inmunización estimuló la producción de anticuerpos a niveles similares a los alcanzados luego de la segunda dosis en todos los grupos inmunizados, lo que sugiere la capacidad de las formulaciones para generar memoria inmunológica. Además, estos resultados respaldan la implementación de un esquema de inmunización simple que pueda ajustarse fácilmente a las rutinas de manejo habituales de los animales. Resultados similares fueron observados en estudios anteriores de nuestro grupo (Reidel et al., 2019).

Hasta donde sabemos, no existen reportes previos sobre el uso de liposomas formulados con lipopéptidos tipo Gemini o mananos en bovinos. Sin embargo, algunos estudios han explorado formulaciones similares. Nishimura et al., (2013) demostraron que la inmunización de terneros machos con dos dosis de un antígeno recombinante de *N. caninum* formulado con liposomas recubiertos con oligomanosa indujo la producción de anticuerpos séricos específicos 15 días después de la segunda dosis. Por otro lado, Kornuta et al., (2020) evaluaron una vacuna génica contra el herpesvirus bovino tipo 1 formulada con liposomas manosilados en bovinos, observando la producción de anticuerpos específicos tras dos dosis vacunales y un refuerzo 60 días después

de la primera vacunación. No obstante, las diferencias en los esquemas de inmunización y en el tipo de antígeno vacunal utilizado dificultan la comparación directa con nuestros resultados. Los hallazgos de este estudio destacan la capacidad adyuvante tanto de los mananos como de los lipopeptidos tipo Gemini, particularmente AG2-C16, en combinación con liposomas, demostrando su potencial para potenciar la respuesta inmune en este modelo animal.

Una de las funciones principales de los adyuvantes es estimular un perfil inmunológico específico. En cuanto a la evaluación de las subclases de IgG en sangre, en este estudio se observó que todas las formulaciones vacunales estimularon la producción de IgG1 e IgG2 específicas contra los cuatro antígenos evaluados. En particular, luego de la segunda dosis (día 35) y post-refuerzo (día 276), las formulaciones Lip+CpG-ODN+Rec, Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+AG2C16+Rec promovieron un aumento significativo de IgG1 para la mayoría de los antígenos, mientras que la formulación Lip+Man+Rec indujo una respuesta robusta de IgG1 frente a todos ellos. En cuanto a la IgG2, todas las formulaciones incrementaron significativamente sus niveles, aunque con variaciones según el antígeno y la formulación específica. La administración de proteínas recombinantes de *N. caninum* formuladas con Lip+CpG-ODN en novillos (Novoa et al., 2021) indujo niveles elevados de IgG1 específica frente a los cuatro antígenos utilizados, 7 días después de la segunda dosis, siendo significativamente superiores a los grupos control. Los niveles de IgG2 específica frente a tres antígenos fueron más altos tras la segunda dosis. Las respuestas diferenciales observadas entre antígenos en el presente estudio pueden deberse, en parte, a variaciones en las propiedades antigénicas intrínsecas. Sin embargo, la evaluación de la contribución específica de cada componente estuvo fuera del alcance de este estudio. En este sentido, y con el objetivo de explorar estrategias orientadas a mejorar la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes utilizados, en el Anexo III se presenta un abordaje de optimización de la construcción recombinante de FnbpA.

La inmunidad protectora no depende únicamente de la producción de anticuerpos, sino también de la activación de la respuesta inmune celular. En particular, se ha demostrado que los perfiles Th1 y Th17 desempeñan un papel importante en el control de la infección por *S. aureus* (Lin et al., 2009; Brown et al., 2015; Rainard et al., 2022a). Por lo tanto, caracterizar el perfil inmunológico estimulado por los adyuvantes podría proporcionar información valiosa sobre los aspectos funcionales de las formulaciones. Nuestros resultados indican que la inmunización con las formulaciones evaluadas favoreció predominantemente una respuesta Th1, evidenciada por el aumento en la producción de IFN- γ en todos los grupos inmunizados en comparación con los controles, con un efecto significativo en los grupos Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec, lo cual sugiere un mayor potencial de estas formulaciones para potenciar la inmunidad mediada por células. La producción de IgG2 en respuesta a estas formulaciones es

consistente con la inducción de un perfil Th1. Se ha descrito que CpG-ODN ejerce una acción inmunoestimulante que induce la diferenciación de células T hacia el perfil Th1 (Chu et al., 1997). Sin embargo, la estructura del ODN, determinada por su secuencia y el tipo de enlaces, puede inducir distintas respuestas según la especie (Mena et al., 2003). Los CpG-ODN utilizados en este estudio poseen enlaces fosfodiéster a lo largo de toda su cadena. Esta conformación presenta ventajas importantes frente a los CpG-ODN con enlaces PS: los enlaces fosfodiéster reducen los costos de síntesis, minimizan los efectos adversos reportados por el uso prolongado de CpG-ODN PS, y favorecen un reconocimiento más natural por parte de los receptores intracelulares. Hasta donde se sabe, este es el primer reporte sobre el efecto de este tipo de CpG-ODN en la respuesta celular en bovinos. Además, se observó una tendencia hacia una mayor producción de IL-17 en los grupos inmunizados, especialmente en aquellos formulados con Lip+Mananos+Rec y Lip+CpG-ODN-AG2C16+Rec, aunque con una considerable variabilidad entre individuos. Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas entre los animales inmunizados y sus controles vehiculares, incluso considerando que algunos animales no inmunizados y del grupo Lip+CpG-ODN-AG2C16 mostraron niveles detectables de IL-17, dificulta el análisis de este resultado. Esta variabilidad podría estar influenciada por factores intrínsecos de los animales (variabilidad genética, diferencias relacionadas con la edad en la maduración del sistema inmunológico, historial previo de exposición a patógenos) o por las técnicas de cuantificación de citocinas, las cuales podrían haber reducido la sensibilidad para detectar diferencias significativas entre grupos. Investigaciones futuras podrían profundizar en los factores que contribuyen a esta heterogeneidad, permitiendo una mejor interpretación de la respuesta inmune inducida (Usman et al., 2017, Bronzo et al., 2020, Khatonier et al., 2025). Además, la capacidad inmunoestimulante de los vehículos por sí mismos merece ser estudiada en mayor profundidad. Por otro lado, la ausencia de producción detectable de IL-4 e IL-5 sugiere que las formulaciones evaluadas no promovieron una respuesta Th2 significativa. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la capacidad de las formulaciones para inducir una respuesta inmune celular de predominantemente Th1, con una posible contribución del perfil Th17 la cual fue más acentuada en los grupos que incluyeron mananos o la combinación de CpG-ODN y AG2C16 (Lip+Man+Rec y Lip+CpG-ODN-AG2C16+Rec).

Los adyuvantes utilizados aquí están basados en liposomas suplementados con diversos inmunoestimulantes. Aunque las cuatro formulaciones pueden inducir anticuerpos específicos, se ha demostrado que dos de ellas generan una respuesta inmune celular relevante para la infección por *Staphylococcus aureus*: Lip+CpG-ODN+AG2-C16 y Lip+Man. A su vez, el novedoso lipopéptido AG2C16 contribuyó a la estabilización física de la suspensión de Lip+CpG-ODN y potenció, en combinación con este último, la expresión de IFN- γ e IL-17 en comparación con los componentes individuales, sugiriendo un efecto sinérgico entre ambos. Por otra parte, la

suplementación con mananos produjo una respuesta inmune similar, con la ventaja de introducir una única molécula inmunoestimulante, lo que podría ofrecer una mejor relación costo-beneficio. La respuesta Th17 desempeña un papel crucial en la defensa del hospedador frente a patógenos bacterianos extracelulares al promover el reclutamiento de neutrófilos y estimular las defensas antimicrobianas epiteliales en los sitios de infección (Rainard et al., 2020). Esta respuesta combinada puede ser ventajosa para la eliminación bacteriana a través de mecanismos inmunitarios complementarios.

En resumen, los resultados obtenidos durante esta etapa demuestran que los factores de virulencia seleccionados de *S. aureus*, formulados con liposomas que combinan AG2C16, CpG-ODN y mananos, inducen respuestas inmunes humorales y celulares significativas en vaquillonas, con un perfil predominantemente Th1. El análisis comparativo permitió identificar a las formulaciones Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec (G3) y Lip+Man+Rec (G4) como las más promisorias, debido a su capacidad superior para activar un perfil inmunológico equilibrado. Sobre la base de este desempeño, se seleccionaron estas dos formulaciones para evaluar su capacidad protectora frente al establecimiento de una IIM. Por consiguiente, el siguiente capítulo detalla el desafío intramamario experimental llevado a cabo luego del primer parto, en los animales pertenecientes a estos grupos.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

Anatomía estructural glándula mamaria bovina

La glándula mamaria (GM) bovina es un órgano exocrino altamente especializado, considerada como una glándula sudorípara de tipo lóbulo alveolar modificada, la cual ha evolucionado para ejercer un papel clave en la nutrición de la descendencia mediante la producción de leche y calostro. Estructuralmente, la ubre bovina (Figura 11) está compuesta por cuatro glándulas independientes denominadas cuartos mamarios (dos anteriores y dos posteriores) cada uno de los cuales constituye una unidad funcional. A pesar de su agrupación física con su propio pezón y sistema de drenaje ductal exclusivo, existe una estricta independencia funcional entre los cuartos, sin comunicación interna o cruce de leche entre sus sistemas de conductos, lo que limita la propagación de infecciones de un cuarto a otro por vía ductal. Éstos se encuentran sostenidos por un robusto aparato suspensorio compuesto principalmente por ligamentos elásticos medianos y laterales que delimitan cada unidad. (Nickerson & Akers, 2011; Pandey et al., 2018; Mota-Rojas et al., 2024). El tejido funcional de cada cuarto es conocido como parénquima mamario y está organizado en lóbulos y lobulillos que contienen numerosas unidades microscópicas denominadas alvéolos, las cuales constituyen las unidades fundamentales de la producción de leche (Figura 11). Cada alvéolo es una estructura globular, con un diámetro de entre 50 y 250 μm , revestida internamente por una sola capa de células epiteliales mamarias (MEC) de forma cuboidal. Estas células son las responsables directas de la síntesis y secreción de la leche, para lo cual absorben precursores (proteínas, lactosa y grasa) de la red de capilares sanguíneos que rodea la base del alvéolo. Una vez sintetizados, estos componentes son liberados hacia el lumen alveolar, donde la leche se almacena en los periodos entre ordeños. Durante el proceso de lactancia, el almacenamiento de leche se distribuye entre los compartimentos alveolares (60%) y cisternales (40%), donde la acumulación progresiva en el lumen ejerce una presión que aplana las MEC, señalizando la inhibición de la síntesis láctea hasta el vaciado de la glándula. La liberación de leche se activa mediante el reflejo de eyección, donde la oxitocina estimula la contracción de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos, comprimiéndolos y expulsando el contenido hacia los conductos mayores y cisternas para su extracción. (Nickerson & Akers, 2011; Jaswal et al., 2022; Kumar et al., 2022)

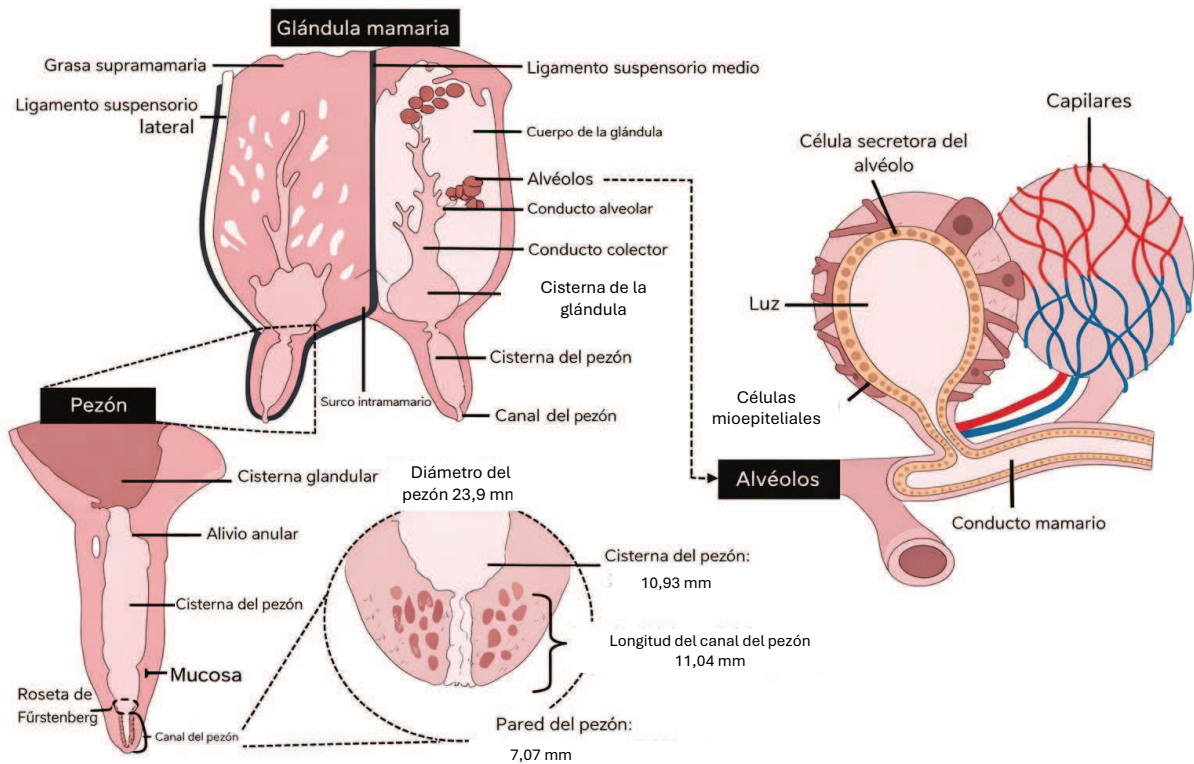


Figura 11: Imagen representativa de la estructura interna de la glándula mamaria bovina. Imagen adaptada de Mota-Rojas et al., 2024.

Defensas de la glándula mamaria

Defensa física natural

El pezón es una estructura elástica de forma cilíndrica o cónica que funciona como el único punto de salida para la leche y, simultáneamente, como la principal vía de entrada para los patógenos hacia el interior de la glándula (Zecconi et al., 2002; Ezzat Alnakip et al., 2014). Su pared está revestida externamente por piel fina, la cual se caracteriza por carecer de glándulas sebáceas y sudoríparas. En su interior aloja la cisterna del pezón, una cavidad con capacidad de entre 10 y 50 mL que se continúa con la cisterna de la glándula (Figura 11). En la base de esta cisterna, justo antes del canal de salida, se encuentra la roseta de Fürstenberg, una estructura de pliegues mucosos que participa tanto en el cierre del conducto por presión como de zona de vigilancia inmunológica local reclutando diferentes poblaciones de leucocitos, principalmente linfocitos y células plasmáticas. La primera línea de defensa de la GM es el canal del pezón, que mide habitualmente entre 5 y 13 mm de longitud. Este conducto se mantiene cerrado mecánicamente entre ordeños gracias a un robusto esfínter de músculo liso dispuesto de forma circular y longitudinal, el cual se contrae para evitar el escape de leche y la entrada de microorganismos. Complementando esta barrera física, el canal está relleno por un tapón de queratina, un material ceroso que atrapa físicamente a los microorganismos y contiene una potente mezcla de ácidos

grasos bacteriostáticos (como el láurico, mirístico y linolénico) y proteínas catiónicas que dañan la pared celular de patógenos. Éstos, junto a la roseta, constituyen el enlace crítico entre las barreras físicas y el sistema inmune de la GM (Oviedo-Boyso et al., 2007; Ezzat Alnakip et al., 2014; Pandey et al., 2018). Durante el ordeño, este tapón se elimina y el conducto se distiende, quedando temporalmente expuesto hasta que el esfínter se contrae por completo, aproximadamente dos horas después. Debido a la eficacia de esta barrera, la luz intramamaria se mantiene aséptica, lo que condiciona las características inmunológicas del epitelio mamario (Rainard & Riollet, 2006). Si los microorganismos logran evadir esta barrera y penetrar en el lumen, se enfrentan a un complejo entramado de factores solubles y celulares diseñados para eliminar la amenaza de forma inmediata o específica (Oviedo-Boyso et al., 2007; Ezzat Alnakip et al., 2014)

Inmunidad en GM

Inmunidad innata

La inmunidad innata de la GM constituye la primera línea de defensa interna que se activa inmediatamente después de que los patógenos logran ingresar. Este sistema se basa en la capacidad de reconocer PAMPs mediante los RRP como los receptores tipo Toll presentes en células residentes y migrantes. Esta defensa se divide en componentes celulares (neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células epiteliales mamarias) y humorales (lactoferrina, transferrina, lisozima, lacto peroxidasa y mieloperoxidasa, sistemas de complemento, citocinas, quimiocinas y péptidos de defensa del hospedador) (Wellnitz & Bruckmaier, 2021; Ezzat Alnakip et al., 2014; Sordillo, 2018).

Componentes humorales

La respuesta humoral en la glándula mamaria bovina comprende la acción coordinada de factores solubles y mecanismos que participan en la inmunidad innata, inhibiendo el crecimiento bacteriano, y en la modulación de la inflamación (Germon & Martins, 2023).

El *sistema del complemento*, presente en la leche en concentraciones bajas pero funcionales, desempeña un papel dual en la defensa de la glándula mamaria al actuar en la eliminación directa de patógenos y funcionar como un potente sistema de alarma inflamatoria. En glándulas mamarias sanas, la vía alternativa constituye la principal ruta de activación. Sus funciones efectoras incluyen la opsonización, mediante el depósito de fragmentos de C3 (C3b/iC3b) sobre la superficie bacteriana para facilitar la fagocitosis, y la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), que genera poros en los patógenos provocando su lisis osmótica. Asimismo, la liberación del fragmento C5a resulta crucial; esta potente anafilatoxina actúa como el principal factor quimiotáctico para el reclutamiento masivo y la activación de neutrófilos desde el torrente

sanguíneo hacia el sitio de la infección (Rainard & Riollet, 2006; Shishido et al., 2012; Germon & Martins, 2023). Por su parte, los anticuerpos naturales (principalmente IgM) de características poli reactivas proporcionan una vigilancia inmunológica inmediata, reconociendo una amplia variedad de patógenos, con baja afinidad, pero de manera rápida, facilitando su opsonización temprana y siendo a su vez potentes iniciadores de la cascada del complemento (Shishido et al., 2012).

La lactoferrina es una glicoproteína que priva de hierro al área infectada, lo que provoca estrés oxidativo, previene la multiplicación y el crecimiento bacteriano, y favorece la supervivencia de las células del hospedador. La transferrina es una proteína fijadora de hierro que llega a la leche desde el suero sanguíneo mediante transcitosis o por exudación de plasma durante la mastitis. Su función es bacteriostática, ya que compite con los patógenos por el hierro disponible y daña la membrana de las bacterias Gram-negativas al alterar su permeabilidad. En cuadros agudos de mastitis, sus niveles aumentan significativamente incluso antes que los de la lactoferrina (Rainard & Riollet, 2006; Ezzat Alnakip et al., 2014).

La lisozima y la lactoperoxidasa son enzimas bactericidas clave en la secreción láctea. La primera actúa hidrolizando el peptidoglicano de la pared celular, sinergizando con la lactoferrina para aumentar la susceptibilidad de patógenos como los estafilococos mientras que la segunda utiliza peróxido de hidrógeno y tiocianato para generar hipotiocianato, un potente oxidante que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Ezzat Alnakip et al., 2014; Germon & Martins, 2023).

Por su parte, las citoquinas y quimiocinas actúan como mensajeros que orquestan la respuesta inmune en la glándula mamaria. El TNF- α y la IL-1 β inician la inflamación temprana y la migración leucocitaria, siendo el TNF- α el principal responsable de los síntomas sistémicos en mastitis agudas. La IL-8 (CXCL8) es la quimiocina crítica que guía la diapédesis y el reclutamiento de neutrófilos hacia el lumen alveolar, mientras que la IL-10 cumple un rol antiinflamatorio esencial para limitar el daño tisular y favorecer la resolución de la infección (Rainard & Riollet, 2006, Oviedo-Boyso et al., 2007, Ezzat Alnakip et al., 2014)

Componentes celulares

La defensa celular innata depende de una red de células inmunitarias (neutrófilos, macrófagos, NK y dendríticas) que patrullan el tejido y el lumen alveolar para neutralizar la invasión (Wellnitz & Bruckmaier, 2021). A su vez, las MEC actúan como sensores biológicos activos de la inmunidad innata mediante receptores TLR2 y TLR4 y la secreción de quimiocinas (como IL-8, CXCL1, CXCL2 y CXCL3) (Rainard et al., 2022a). Estas células epiteliales están unidas por uniones estrechas y conforman la barrera sangre-leche, la cual es semipermeable separando los compartimentos lácteos del fluido extracelular y la vasculatura. En la GM sana estas uniones son

altamente impermeables, pero durante la mastitis, la integridad de esta barrera se reduce significativamente debido a la acción directa de los patógenos o por la influencia de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β , que provocan la apertura facilitando la diapédesis masiva de neutrófilos desde la sangre hacia el lumen alveolar y permite el paso de factores humorales protectores, como inmunoglobulinas, el sistema del complemento y proteínas de fase aguda, para neutralizar a los invasores (Wellnitz & Bruckmaier, 2021; Rainard et al., 2022a; Germon & Martins, 2023). Las MEC, además ejecutan una autodefensa mediante la síntesis y liberación de péptidos antimicrobianos (defensinas), entre los que destacan la proteína antimicrobiana lingual (LAP) y el péptido antimicrobiano traqueal (TAP) cuyas propiedades bactericidas dañan la pared celular de *S. aureus* y *E. coli*, limitando su proliferación antes de que se active la inmunidad adaptativa (Ezzat Alnakip et al., 2014; Germon & Martins, 2023)

Macrófagos

Los macrófagos constituyen el tipo celular predominante en leche y tejidos en la GM sana, tanto durante la lactancia como en el periodo seco o involución, constituyendo entre el 35% y 80% de los leucocitos en la leche (Ezzat Alnakip et al., 2014). Su función es polifacética, actuando tanto en la respuesta inmunológica inmediata como en la coordinación de la respuesta a largo plazo. Actúan como centinelas en el parénquima mamario reconociendo patógenos a través de sus receptores (CD14, TL2, TLR4). A su vez actúan como fagocitos profesionales ingiriendo patógenos y eliminándolos mediante proteasas y ROS. Esta función en leche se ve disminuida en ocasiones por la ingesta de forma indiscriminada de gotas de grasa y caseína, lo que reduce su capacidad bactericida. Su función más crítica se centra en secretar citoquinas proinflamatorias (como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12) y mediadores lipídicos (prostaglandinas y leucotrienos), los cuales activan el endotelio vascular para permitir el reclutamiento masivo de neutrófilos. A su vez, sirven de puente hacia la inmunidad adaptativa al procesar antígenos bacterianos y presentarlos a los linfocitos T en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II). Por último, participan activamente en la resolución de la infección mediante la esféricitosis, proceso por el cual eliminan neutrófilos agotados y detritos celulares, minimizando el daño al epitelio secretor y facilitando el retorno a la homeostasis (Rainard & Riollet, 2006; Mosser & Edwards 2008; Ezzat Alnakip et al., 2014)

Neutrófilos

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) constituyen la segunda línea de defensa de la inmunidad innata y son las células efectoras más críticas durante la fase aguda de la mastitis. Aunque su presencia es mínima en la GM sana (3-26%), frente una infección migra masivamente desde la sangre, llegando a representar entre el 90% y el 95% del recuento total de células somáticas (Rainard & Riollet 2003; Ezzat Alnakip et al., 2014). Esta movilización depende de la

pérdida de la integridad de la barrera sangre-leche permitiendo la diapédesis masiva (Wellnitz & Bruckmaier 2021). La migración de los PMN desde los capilares al lumen alveolar es un proceso crítico guiado por una cascada de señales moleculares que incluye IL-8 (CXCL8), CXCL3 y C5a, que actúan como quimioatrayentes reclutando y activando neutrófilos. El reclutamiento se produce en etapas, primero, la L-selectina (CD62L) media el contacto inicial y rodamiento sobre el endotelio, y posteriormente, las integrinas $\beta 2$ (Mac-1 o CD11b/CD18) facilitan la unión firme mediante ligandos endoteliales como ICAM-1, deteniendo el movimiento. Posteriormente sucede la transmigración hacia el sitio de infección, en donde el neutrófilo puede deformarse gracias a su núcleo multilobulado y atravesar la barrera sangre -leche (Rainard & Riollet, 2003, 2006; Oviedo-Boyso et al., 2007; Ezzat Alnakip et al., 2014).

Los PMN actúan como las principales células efectoras responsables del reconocimiento, fagocitosis y eliminación de patógenos invasores. Su arsenal bactericida opera a través de dos mecanismos paralelos: i) sistema oxígeno-dependiente o estallido respiratorio, que utiliza la NADPH-oxidasa y la mieloperoxidasa para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) e hipohalitos altamente citotóxicos, y ii) el sistema oxígeno-independiente, que libera desde sus gránulos citoplasmáticos péptidos como las defensinas, lactoferrina, lisozima y enzimas proteolíticas como la elastasa y catepsinas. Más allá de la ingestión directa, los neutrófilos pueden además formar trampas extracelulares (NETs). Sin embargo, la eficacia de los neutrófilos disminuye drásticamente al ingresar al compartimento lácteo debido al agotamiento de sus reservas de glucógeno durante la diapédesis y a la ingestión indiscriminada de grasa y caseína. Este consumo de componentes lácteos provoca un daño estructural severo, incluyendo la pérdida de gránulos citoplasmáticos y de los pseudópodos necesarios para la quimiotaxis. (Burston y Erskine 2003; Rainard & Riollet, 2006; Ezzat Alnakip et al., 2014; Germon & Martins, 2023).

Investigaciones recientes demostraron que los PMN bovinos representan una población heterogénea que comprende al menos dos subpoblaciones distinguibles por la expresión de MHC-II (MHC-IIpos), denominada reguladores, con capacidades funcionales superiores a los clásicos (MHC-IIneg). Estos neutrófilos MHC-IIpos poseen un arsenal bactericida más potente, caracterizado por una mayor producción de ROS y una eficiencia fagocítica que se conserva incluso tras ingresar al entorno lácteo. Actúan además como mediadores inmunológicos al acumularse en la leche durante la mastitis subclínica y correlacionarse con la presencia de linfocitos T, lo que sugiere que desempeñan un papel crítico en la modulación de la respuesta adaptativa y la persistencia de infecciones crónicas (Rambault et al., 2023).

Natural Killer

Las NK son linfocitos granulares grandes que actúan como componentes esenciales de la inmunidad innata en la glándula mamaria. A diferencia de otros linfocitos, poseen la capacidad

de ejercer citotoxicidad de forma independiente al MHC, lo que les permite reconocer y destruir células infectadas o dañadas sin una sensibilización previa. En el tejido mamario bovino, se ha comprobado que tienen actividad bactericida directa contra patógenos como *S. aureus* y bacterias Gram-negativas, utilizando proteínas de la familia tipo saposina y mecanismos de lisis mediante exocitosis de gránulos. Además de su rol destructor, funcionan como centinelas que orquestan la respuesta inmune al ser una fuente temprana de IFN- γ . Su proliferación y funciones efectoras son reguladas y potenciadas por la presencia de citoquinas como la IL-2 y la IL-12 (Rainard & Riollet, 2006; Ezzat Alnakip et al., 2014).

Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa representa la segunda línea de defensa de la GM y se activa específicamente cuando los patógenos logran evadir o no son completamente eliminados por los mecanismos innatos. A diferencia de la respuesta innata, este sistema se caracteriza por su alta especificidad hacia determinantes antigénicos particulares del patógeno y su capacidad única para generar memoria inmunológica. Esta memoria garantiza que, ante un segundo encuentro con el mismo antígeno, el sistema desarrolle una respuesta mucho más rápida, considerablemente más fuerte y duradera, lo que resulta en una eliminación del patógeno significativamente más efectiva (Sordillo & Streicher, 2002; Rainard et al., 2022b).

A su vez, la respuesta inmunitaria adaptativa de la GM bovina se organiza como un sistema regional y autónomo, funcionalmente independiente del sistema inmunitario mucosal común. A diferencia de otras superficies mucosas, la GM de los rumiantes carece de tejido linfoide asociado y de moléculas clásicas de direccionamiento (*homing*), como la integrina $\alpha 4\beta 7$ y MadCAM-1, por lo que el tráfico linfocitario depende de mecanismos periféricos y sistémicos mediados por adhesinas como VCAM-1 y PNA_d. Esta organización favorece una inmunidad predominantemente celular, en particular mediada por linfocitos T de memoria, cuya activación permite respuestas leucocitarias más rápidas y amplificadas tras reexposiciones, reflejando la existencia de una memoria inmunológica local más relevante que la producción de anticuerpos *in situ*. Dado que cada mitad de la ubre posee un drenaje linfático independiente, la defensa se estructura en un eje regional en el que las células presentadoras de antígeno migran hacia ganglios linfáticos asociados o sistémicos para activar linfocitos específicos que posteriormente retornan al tejido. Esta autonomía inmunológica constituye una adaptación evolutiva clave para mantener la homeostasis mamaria, permitiendo una vigilancia eficaz frente a patógenos y limitando, al mismo tiempo, la infiltración de células inflamatorias inespecíficas procedentes de otros compartimentos mucosales (Rainard et al., 2022b).

Este sistema se divide en dos ramas principales que trabajan de forma coordinada: la inmunidad celular y la inmunidad humoral (Sordillo, 2018).

Inmunidad celular

Esta rama de la inmunidad adaptativa depende fundamentalmente de los linfocitos T (LT), los cuales están programados para reconocer antígenos específicos mediante receptores de membrana tras ser presentados por moléculas del MHC por parte de las CPA profesionales. Dentro de estas las células dendríticas (CDs) desempeñan el papel más crítico, definiendo de este modo la especificidad, diversidad y las características de memoria del sistema inmune. Las células T pueden subdividirse a su vez en células T $\alpha\beta$, que incluyen las células CD4+ (T colaboradoras Th) y CD8+ (T citotóxicas Tc), y las células T $\gamma\delta$. Las células Th pueden clasificarse aún más basándose en agrupaciones funcionales que incluyen Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras (*Tregs*) (Sordillo, 2018).

Células dendríticas

En la glándula mamaria, las CDs se localizan estratégicamente en los epitelios alveolar y ductal, así como en el tejido conectivo, funcionando como centinelas capaces de capturar antígenos que han penetrado la barrera física. Una vez que procesan el patógeno, las CDs migran a través de los vasos linfáticos aferentes hacia los ganglios linfáticos regionales, principalmente los ganglios supramamarios. En estos ganglios drenantes donde las CDs, reconocidas como las únicas CPA con la capacidad de activar eficientemente a los linfocitos T vírgenes, presentan los antígenos específicos mediante moléculas del MHC-II. Esta interacción en los ganglios define la expansión clonal, la diversidad y la memoria del sistema inmune (Rainard et al., 2022b).

Linfocitos T CD4+

Esta población celular actúa como coordinadora de la respuesta adaptativa en la GM teniendo como función principal coordinar la defensa mediante la secreción de una amplia gama de citoquinas inmunoregulatoras tras el reconocimiento de antígenos específicos presentados por moléculas del MHC II (Sordillo, 2018; Germon & Martins, 2023). Dependiendo el perfil de citoquinas que secreten se diferencian en distintos subtipos funcionales. Las células Th1 facilitan la inmunidad mediada por células mediante la producción de IFN- γ e IL-2, potenciando la capacidad destructiva de macrófagos y neutrófilos, además de promover la expansión clonal linfocitaria. Por su parte, las células Th2 dirigen la respuesta humoral a través de la secreción de IL-4, IL-5 e IL-10, citoquinas esenciales para la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Las células Th17 resultan fundamentales al producir IL-17A, IL-17F e IL-22, las cuales median el reclutamiento masivo de neutrófilos y estimulan la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMPs) en las células epiteliales. Finalmente, los linfocitos Tregs, caracterizados por la expresión de CD25 y la producción de IL-10 o TGF- β , cumplen la función crítica de moderar la inflamación y resolver la respuesta inmune, protegiendo así la

integridad del tejido mamario frente a daños colaterales excesivos (Sordillo & Streicher, 2002; Sordillo, 2018; Rainard et al., 2022b; Germon & Martins, 2023).

Linfocitos CD8+

Por su parte los linfocitos T CD8+ desempeñan un papel multifacético en la defensa de la glándula mamaria, destacándose principalmente por su citotoxicidad específica, mediante la cual inducen la apoptosis de células infectadas o dañadas que presentan péptidos derivados de antígenos microbianos en el contexto del MHC clase I, eliminando así nichos bacterianos intracelulares. Además de esta función efectora, actúan como células de "limpieza" (*scavengers*), removiendo células secretoras envejecidas cuya persistencia aumentaría la susceptibilidad a nuevas infecciones. Su capacidad de inmunoregulación y supresión es igualmente crítica, ya que modulan la respuesta inflamatoria para evitar daños colaterales. En casos de mastitis por *Staphylococcus aureus*, ciertas subpoblaciones de CD8+ pueden inhibir la proliferación de linfocitos CD4+. Estas células también contribuyen significativamente mediante la producción de citoquinas como IFN γ , TNF α e IL-17. Finalmente, su función como células de memoria residentes integradas en el epitelio les permite vigilar el entorno de manera constante, orquestando una respuesta inmunitaria inmediata y el reclutamiento de refuerzos ante una reexposición al patógeno (Sordillo & Streicher, 2002, Sordillo, 2018; Rainard et al., 2022b; Germon & Martins, 2023).

En la glándula mamaria sana, los linfocitos T CD8+ constituyen la subpoblación linfocitaria predominante, localizándose tanto en el estroma conectivo como integrados en el epitelio ductal para cumplir funciones homeostáticas de "limpieza" celular, mientras que los linfocitos T CD4+ se encuentran dispersos principalmente en el tejido conectivo y la lámina propia con un fenotipo de memoria activado (Sordillo & Streicher, 2002). Aunque en la secreción de glándulas secas la relación CD4/CD8 es superior a uno, durante la lactancia normal los linfocitos T CD4+ son menos abundantes en la leche y el parénquima en comparación con los linfocitos CD8+. Frente a un contexto de infección por *Staphylococcus aureus*, la dinámica cambia drásticamente mediante un reclutamiento masivo de linfocitos CD4+ hacia el área infectada, frecuentemente invirtiendo la relación CD4/CD8 a favor de los cooperadores para dirigir la respuesta adaptativa. En este escenario, los linfocitos CD8+ activados complementan la defensa mediante citotoxicidad específica contra nichos bacterianos intracelulares, aunque su orientación funcional es altamente dependiente del estadio de la lactancia, mostrando mayor actividad supresora en el posparto. No obstante, la eficacia de esta respuesta coordinada suele verse limitada en mastitis crónicas por *S. aureus* debido a la aparición de subpoblaciones de linfocitos CD8+ con funciones supresoras que, sumadas a la inducción de citoquinas reguladoras como la IL-10, inhiben la proliferación de los CD4+ y atenúan la inflamación necesaria, facilitando la persistencia bacteriana y la evasión del

sistema inmune (Sordillo & Streicher, 2002; Sordillo, 2018; Rainard et al., 2022b; Germon & Martins, 2023).

Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ constituyen una población celular única y fundamental del sistema inmunitario de los rumiantes, diferenciándose de manera significativa de los modelos humanos y de roedores tanto por su abundancia como por sus funciones especializadas en las barreras epiteliales (Baldwin & Telfer, 2015). En animales jóvenes pueden representar hasta el 60 % de los linfocitos mononucleares circulantes, y mantienen una presencia considerable en adultos, con proporciones que oscilan entre el 8 y el 18 %. Estas células se dividen en dos subpoblaciones principales en función de la expresión del marcador WC1. La subpoblación WC1⁺, predominantemente CD2⁻ y CD8⁻, circula en la sangre y migra de forma masiva hacia los sitios de inflamación. En contraste, los linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁻ expresan CD2 y CD8 y se localizan preferentemente como células centinela en las superficies mucosales y en el epitelio intestinal (Baldwin & Telfer, 2015; Rainard et al., 2022b). En la glándula mamaria, los linfocitos T $\gamma\delta$ actúan como un puente inmunológico clave, integrando funciones de vigilancia epitelial y citotoxicidad directa con la capacidad de reconocer patógenos a través del receptor híbrido WC1. Como efectores centrales de la inmunidad tipo 3, estas células secretan IL-17A e IFN- γ que, entre otras acciones, favorecen la síntesis de quemoquinas que promueven el reclutamiento masivo de neutrófilos. Paralelamente, contribuyen al mantenimiento de la homeostasis tisular y a la resolución de la inflamación a través de subpoblaciones con un perfil regulador, productoras de IL-10 y TGF- β .

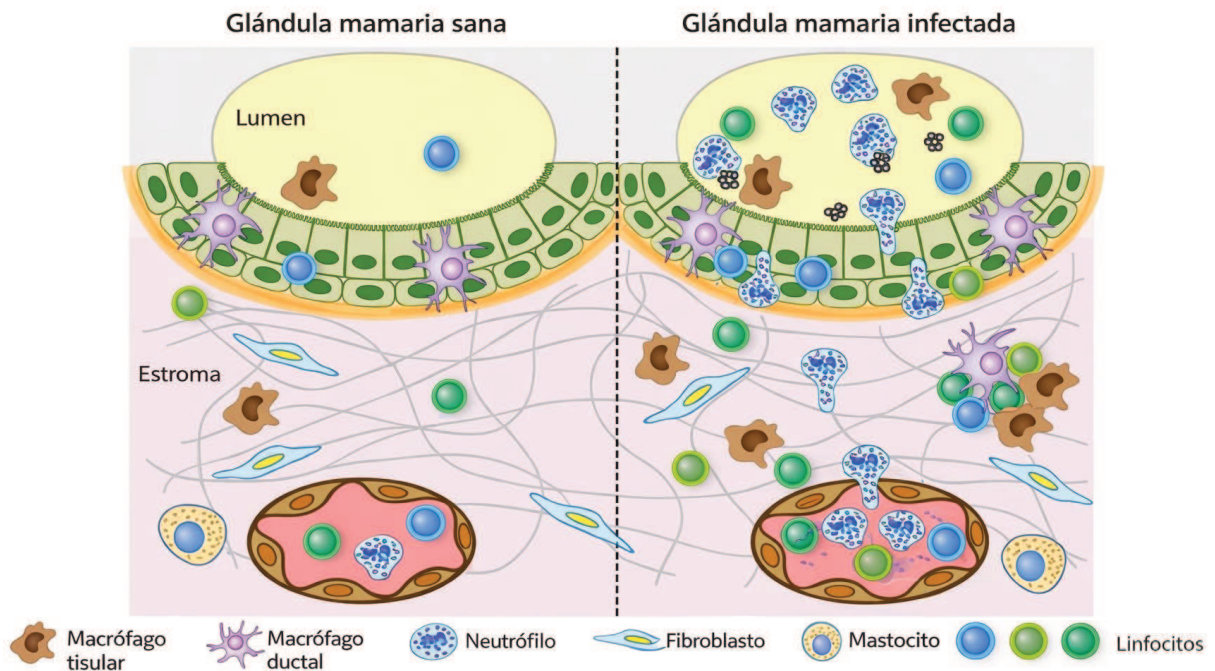


Figura 12. La glándula mamaria sana contiene pocos leucocitos, con macrófagos ductales y algunos linfocitos dispersos. Durante la infección, se produce una fuerte afluencia de células inflamatorias (principalmente neutrófilos, monocitos y varios tipos de linfocitos) y en infecciones crónicas pueden formarse agregados y estructuras linfoides terciarias. Imagen adaptada de Rainard et al., 2022a.

Inmunidad Humoral

La respuesta humoral de la inmunidad adaptativa en la GM tiene como objetivo principal la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) específicos para neutralizar, aglutinar u opsonizar patógenos. A diferencia de los mecanismos innatos, esta rama se caracteriza por su especificidad antigénica y la generación de memoria inmunológica, permitiendo una respuesta significativamente más rápida, vigorosa y persistente ante reexposiciones al mismo patógeno.

La orquestación depende de una interacción celular coordinada, donde los linfocitos B, mediante sus receptores de superficie (BCR), internalizan y presentan antígenos específicos a los linfocitos Th(CD4+) a través del MHC-II. Esta sinapsis inmunológica, que induce la producción de citocinas como la IL-2, desencadena la proliferación y diferenciación de los linfocitos B en dos poblaciones críticas, las células plasmáticas y las células B de memoria. Mientras que las células plasmáticas actúan como unidades efectoras de síntesis masiva de anticuerpos localizadas estratégicamente en el parénquima y zonas de alta exposición (como el pezón y la roseta de Fürstenberg), las células B de memoria garantizan una vigilancia de largo plazo y una respuesta acelerada ante desafíos. A diferencia de la marcada variabilidad que presentan las subpoblaciones de linfocitos T, la proporción de linfocitos B en la GM se caracteriza por una notable estabilidad

funcional a lo largo de las diversas etapas del ciclo de lactancia, consolidando así la base de la memoria inmunológica local (Sordillo, 2018; Germon & Martins, 2023)

Dinámica de Inmunoglobulinas en la Glándula Mamaria

La IgG1 es el isotipo predominante en el calostro y la leche. Su presencia masiva se debe a un transporte selectivo desde el torrente sanguíneo mediante el receptor neonatal Fc (FcRn) (Ezzat Alnakip et al., 2014; Wellnitz & Bruckmaier, 2021). Fisiológicamente, la IgG1 se une preferentemente a los receptores Fc γ de los macrófagos locales, desempeñando un papel fundamental en las etapas iniciales de la vigilancia inmunológica y en la opsonización, facilitando la fagocitosis mediada por macrófagos y neutrófilos. Por el contrario, la IgG2 mantiene concentraciones basales muy bajas en la glándula sana, pero aumenta drásticamente durante la mastitis al ser transportada libremente desde la sangre tras la pérdida de integridad de la barrera sangre-leche. Esta subclase es considerada la opsonina crítica para la defensa intramamaria, ya que los neutrófilos reclutados masivamente hacia el tejido infectado aumentan la expresión de sus receptores Fc específicos para IgG2, facilitando una eliminación bacteriana eficiente (Hine et al., 2019; Germon & Martins, 2023). Burton & Erskine, (2003) proponen un modelo el cual establece una ventana crítica entre las 24 y 48 horas posinfección, donde la carga bacteriana debería disminuir como resultado de una fagocitosis activamente direccionada por la IgG2. Sin embargo, la eficacia de este mecanismo depende de que el reclutamiento celular coincida con la llegada de niveles suficientes de esta opsonina, de lo contrario, se produce un desacople efector donde el aumento de células somáticas es ineficaz para contener la multiplicación bacteriana. La IgM actúa como un potente efector en las primeras etapas de la infección. Su estructura pentamérica le confiere una alta eficiencia en la aglutinación bacteriana, la neutralización de toxinas y la activación de la cascada del sistema del complemento. Por su parte, la IgA aunque en otras especies es la Ig predominante en mucosas, en la GM bovina tiene un rol más localizado. Es producida *in situ* por células plasmáticas glandulares y su función principal es el bloqueo de la adherencia bacteriana al epitelio mamario. Cabe destacar que, en rumiantes, no actúa como una opsonina eficiente para los neutrófilos (Sordillo & Streicher, 2002; Germon & Martins, 2023).

Inmunidad tipo 3 en GM

La inmunidad de tipo 3 (también denominada inmunidad tipo 17) engloba componentes tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa, actuando como un puente integrador entre ambas. Su brazo innato está representado por células linfoides innatas (ILC3) y linfocitos $\gamma\delta$, que proporcionan una defensa inmediata al reconocer PAMPs. Su brazo adaptativo se basa en linfocitos Th17 (CD4+) y Tc17 (CD8+), los cuales confieren especificidad y memoria inmunológica tras el procesamiento de antígenos por células presentadoras. La inmunidad de tipo 3 constituye un eje de defensa especializado en la protección de las barreras epiteliales utilizando

como señales maestras las citoquinas IL-17A, IL-17F y IL-22. Esta respuesta orquestada tiene como objetivo principal el reclutamiento masivo de neutrófilos y la estimulación del epitelio mamario para que produzca sus propios péptidos antimicrobianos y quimiocinas de alarma. Mientras que las células innatas ofrecen una alerta temprana, el desarrollo de linfocitos Th17 de memoria residente permite que la glándula responda con una velocidad y vigor mucho mayores ante un segundo desafío (Porcherie et al., 2016; Rainard et al., 2020; Rainard et al., 2022a).

Staphylococcus aureus y su impacto en la respuesta inmune frente al desafío IM.

A pesar de la robustez de los mecanismos de defensa de la GM bovina descritos, el control de IIM por *Staphylococcus aureus* sigue siendo un desafío debido a la capacidad del patógeno para establecer estados de persistencia subclínica y evasión inmunitaria. Es por esto por lo que desde hace décadas diversos grupos de investigación han abordado el desarrollo de vacunas contra IIM por *S. aureus*, así como diversos modelos para evaluar la eficacia vacunal. Sin embargo, los resultados entre grupos han sido históricamente variables e inconsistentes debido tanto a la complejidad del patógeno, como a las variaciones entre las condiciones a las cuales se realizan las evaluaciones (Mata et al., 2023).

Los estudios realizados bajo condiciones de desafío natural suelen presentar importantes limitaciones estadísticas, principalmente asociadas a la baja incidencia de nuevas IIM durante el período de observación. Esta baja frecuencia de eventos obliga a incluir un número muy elevado de animales para alcanzar un poder estadístico adecuado, lo que dificulta la confirmación de la eficacia protectora de las formulaciones evaluadas (Knight –Jones et al., 2014; Rainard et al., 2022a). Estas limitaciones han sido reportadas en ensayos con diferentes tipos de vacunas, donde la variabilidad inherente al campo y la persistencia de infecciones subclínicas condicionan la interpretación de los resultados (Camusone et al., 2022; Vidlund et al., 2024).

Por el contrario, los modelos de desafío experimental controlado permiten evaluar de forma directa y estandarizada la capacidad del sistema inmune para responder ante una carga bacteriana conocida (Knight Jones et al., 2014; Rainard et al., 2021). Sin embargo, la aplicación de estos modelos en animales inmunizados ha puesto de manifiesto que las vacunas actuales suelen ofrecer una protección parcial, centrada primordialmente en la reducción de la severidad clínica más que en la exclusión del patógeno. Si bien las estrategias de inmunización pueden potenciar la respuesta humoral sistémica, rara vez logran impedir la colonización inicial o prevenir de manera uniforme el establecimiento de nuevas IIM (Middleton, 2008). La evidencia de otros trabajos de desafío experimental subraya esta disparidad. Mientras que algunas investigaciones reportan una disminución de los signos clínicos y una reducción del RCS sin lograr disminuir la carga bacteriana, otros estudios muestran una reducción significativa de las unidades formadoras de

colonias (UFC) en leche, pero sin variaciones en los niveles de inflamación (Prenafeta et al., 2010; Alabdullah et al., 2020)

Otro factor que influye en la variabilidad de la eficacia de las estrategias de control inmunológico se relaciona con características particulares de *S. aureus*. Este microorganismo no actúa como un patógeno uniforme, sino que se organiza en diversos linajes o complejos clonales (CC) con adaptaciones específicas al hospedador que dictan tanto su perfil de virulencia como la intensidad de la respuesta inflamatoria resultante (Campos et al., 2022; Kerro et al., 2024). Estos CC se definen como agrupamientos genéticos de aislamientos que comparten un ancestro común y se identifican mediante la tipificación de secuencias multilocus (MLST) y han evolucionado mediante eventos de salto de hospedador y posterior adaptación al nicho de la glándula mamaria bovina, incorporando factores de virulencia específicos y optimizando su metabolismo para la persistencia en leche (Campos et al., 2022). Las diferencias en el perfil de virulencia e intensidad sugieren que la respuesta inmunitaria es altamente dependiente de la naturaleza de las cepas infectantes y de su capacidad de evasión. Mientras que algunas cepas inducen cuadros clínicos severos con menor capacidad de adaptación a la GM, los linajes adaptados al hospedador tienden a establecer infecciones subclínicas persistentes que favorecen un equilibrio de tolerancia con el sistema inmune (Murphy et al., 2019; Engler et al., 2022). En este pacto de persistencia, el patógeno utiliza estrategias de evasión que permiten su supervivencia silenciosa mientras la glándula mamaria prioriza la homeostasis y la producción láctea, evitando respuestas inflamatorias intensas que podrían dañar el tejido secretor. En consecuencia, esta co-evolución hacia la aceptación del patógeno hace que alcanzar una inmunidad esterilizante (la exclusión total del microorganismo) sea extremadamente difícil en este órgano, lo que explica por qué las estrategias de inmunización actuales suelen ofrecer una protección frecuentemente parcial (Middleton, 2008; Rainard et al., 2022a).

A esta complejidad biológica se suma un desafío crítico en la respuesta humoral que se fue describiendo anteriormente, que es la dinámica diferencial de las inmunoglobulinas en la leche. Mientras que la IgG1 es el isotipo predominante en GM sanas debido a su transporte selectivo vía FcRn, su función se centra en la vigilancia inicial y opsonización para macrófagos. Por el contrario, la IgG2 es considerada la opsonina crítica para la eliminación eficiente del patógeno por parte de los neutrófilos, pero su ingreso a la glándula es restringido y depende de una inflamación masiva que permita la exudación de plasma desde la sangre. Un sesgo en la respuesta hacia la mayor producción de IgG1, puede producir un desacople efector, un reclutamiento masivo de células somáticas que, al carecer de niveles suficientes de IgG2 específica en el lumen alveolar, resultan ineficaces para eliminar al patógeno.

En el presente capítulo se utilizó un modelo de desafío experimental controlado en vaquillonas de primer parto, utilizando la cepa *Staphylococcus aureus* para evaluar la capacidad protectora y la respuesta inmunológica local inducidas por dos formulaciones vacunales experimentales con adyuvantes liposomales (Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec). Mediante una estrategia de inmunización que incluye un refuerzo preparto, se buscó contrarrestar la inmunosupresión fisiológica asociada al periparto y establecer una barrera humoral y celular activa al inicio de la lactancia. A través de la caracterización de la dinámica de inmunoglobulinas (IgG1/IgG2), del perfil de citoquinas y de la reorganización de las poblaciones celulares en leche (CH138A+, CD4+ y CD8+) posteriores a la infección, se buscó determinar si estas estrategias inmunogénicas son capaces de alterar el estado de persistencia bacteriana y potenciar la capacidad efectora de la glándula mamaria.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la respuesta inmune y capacidad de protección generada en vaquillonas por la inmunización con las formulaciones vacunales seleccionadas previamente y luego de un desafío experimental por vía intra-mamaria.

Objetivos particulares

- 1- Evaluar la respuesta inmune humoral sistémica inducida por cada formulación vacunal luego de un refuerzo preparto en vaquillonas lecheras.
- 2- Diseñar un esquema de infección intra-mamaria experimental en vaquillonas lecheras.
- 3- Determinar la capacidad protectora de las formulaciones vacunales frente a la infección intramamaria experimental.
- 4- Evaluar la respuesta inmune humoral en glándula mamaria luego de la infección experimental.
- 5- Caracterizar la dinámica de las poblaciones celulares en la glándula mamaria luego de la infección experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ensayo piloto para la selección de la cepa de *Staphylococcus aureus*

1.1. Cepas de *Staphylococcus aureus*

Las cepas de *Staphylococcus aureus* empleadas en el presente estudio fueron aisladas a partir de casos de IIM en bovinos y su caracterización molecular ha sido reportada previamente (Camussone et al., 2022). Se utilizaron dos cepas aisladas originalmente de IIM en vaquillonas de primera lactancia (Camussone et al., 2022):

- Cepa *S. aureus* 26L, caracterizada como Complejo Clonal (CC) 97, aislada de una IIM subclínica persistente.
- Cepa *S. aureus* 9L, caracterizada como CC1, aislada de una IIM transitoria (aislamiento por única vez durante toda la primera lactancia).

Las características moleculares de ambas cepas, incluyendo el CC, el Tipo de Secuencia (ST), el grupo *agr* y el tipo de cápsula (CP), se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* utilizadas en este estudio

Cepa <i>S. aureus</i>	Tipo de <i>agr</i>	Tipo capsula	Complejo clonal	Tipo de IIM
26L	<i>agrI</i>	<i>Cp5</i>	CC97/ST2187	Persistente
9L	<i>agrIII</i>	<i>Cp8</i>	CC1/ST1	Transitoria

La preparación de las suspensiones bacterianas se realizó siguiendo un protocolo estandarizado. En primer lugar, las cepas se reactivaron a partir de stocks conservados a -80 °C mediante su siembra en placas con agar Columbia suplementado con 5% de sangre bovina las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas en condiciones aerobias. Las bacterias se colectaron con un hisopo y se resuspendieron en PBS 1X estéril. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril hasta alcanzar una concentración final aproximada de 100 UFC/mL. Finalmente, la concentración de las suspensiones se verificó mediante recuento bacteriano en agar Columbia suplementado con 5% de sangre bovina, por el método de microgota (Naghili et al., 2013).

1.2. Ensayo piloto de infección experimental.

Previo al ensayo principal de infección experimental, se diseñó un ensayo piloto cuyo objetivo fue seleccionar una cepa de *S. aureus*, con capacidad para inducir una IIM de tipo subclínico que logre representar o simular las infecciones persistentes. Para ello, se utilizó una vaca múltipara con cinco partos previos, perteneciente al rodeo del Tambo Experimental de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela, cuyos cuatro cuartos mamarios cumplían con los requerimientos indicados (sección 2.2). En dos de los cuartos se inoculó, de manera intramamaria (sección 2.4) 1 mL de suspensión de cada cepa de *S. aureus* (26L o 9L) ajustada a una concentración final de 100 UFC/mL. Un tercer cuarto se utilizó como control negativo, siendo infundido con 1 mL de PBS estéril, mientras que el otro cuarto se mantuvo sin inocular. Se tomaron muestras de leche de cada cuarto mamario durante 7 días, las cuales se usaron para realizar las correspondientes determinaciones de bacteriología y RCS (sección 2.7 y 2.9).

2. Ensayo de inmunización e Infección experimental

2.1. Animales e Inmunización refuerzo al parto

Se partió de 24 vaquillonas primíparas del rodeo del Tambo Experimental de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela, provenientes del estudio de inmunización descrito en el Capítulo 1. En esta etapa se trabajó únicamente con los animales pertenecientes a tres grupos experimentales: grupo control sin tratamiento (C1, n = 8), grupo Lip+CpG-ODN+AG2-C16+Rec (G3, n = 8) y grupo Lip+Man+Rec (G4, n = 8). Los animales de los grupos G3 y G4 recibieron un segundo refuerzo (administrado al parto), consistente en la aplicación de 2 mL/dosis en la región cervical (tabla del cuello), administrado 30 días antes de la fecha probable de parto. Con el fin de evaluar la respuesta inmunitaria, se realizaron extracciones seriadas de sangre mediante punción de la vena coccígea a intervalos semanales. Las muestras fueron procesadas para la obtención de suero y conservadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

2.2. Selección de animales para desafío experimental.

Para la etapa de desafío experimental, desde el momento del parto y de manera semanal hasta la fecha del desafío intramamario, se realizó un seguimiento individual a las 24 vaquillonas incluidas en el estudio. Esto incluyó la palpación clínica de las ubres y la toma de muestras de leche en condiciones asépticas para el aislamiento bacteriano y la determinación del RCS.

Los cuartos mamarios aptos para el desafío se definieron según criterios de sanidad estrictos: RCS inferior a 100.000 células/mL; ausencia de IIM por patógenos mayores (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa* positivo); ausencia de patógenos menores, como *Staphylococcus coagulasa*-negativos. Para la inclusión en el estudio, cada animal debía presentar al menos dos cuartos mamarios que cumplieran simultáneamente con estos criterios. Con base en estos criterios, se seleccionaron 21 vaquillonas pertenecientes a: grupo control sin tratamiento (C1, n = 7), grupo inmunizado con Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec (G3, n = 7) y el grupo inmunizado con Lip+Man+Rec (G4, n = 7).

2.3. *Desafío intramamario experimental*

El ensayo principal se llevó a cabo con las 21 vaquillonas seleccionadas (sección 2.2), Durante todo el período del estudio, los animales permanecieron alojados en el lote de enfermería de la unidad experimental, lo que permitió un manejo controlado y redujo el riesgo de diseminación accidental de la infección durante las rutinas de ordeño. Cabe señalar que, a pesar de su traslado, las vaquillonas recibieron la dieta habitual asignada a su lote original, a fin de evitar alteraciones nutricionales que pudieran influir sobre la respuesta inmune. El ordeño se efectuó en dos turnos diarios, siguiendo las prácticas de rutina establecidas en el tambo experimental.

Cada animal fue inoculado al día 30 posterior al parto preferentemente en dos cuartos mamarios contralaterales (AI: anterior izquierdo, PD: posterior derecho), los cuales recibieron 1 mL de una suspensión bacteriana de la cepa de *S. aureus* 26L, ajustada a una concentración aproximada de 100 UFC/mL (sección 2.4). De esta manera, se obtuvieron 14 unidades experimentales por grupo. Como controles, un tercer cuarto de cada animal recibió 1 mL de PBS 1X estéril, mientras que el cuarto restante no fue inoculado, sirviendo como control interno. El esquema de desafío experimental, incluyendo los parámetros evaluados, se muestra en la Figura 13.

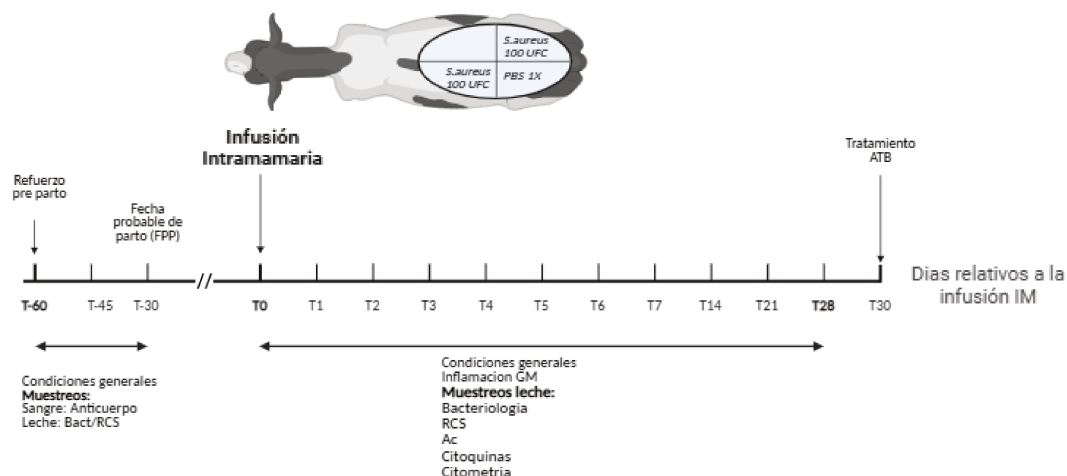


Figura 13. Esquema general del modelo de desafío intramamario con *S. aureus*.

2.4. Técnica de infusión intramamaria

La técnica de infusión intramamaria se realizó luego del ordeño del turno tarde. Consistió en la desinfección previa de la punta de los pezones con alcohol al 70 %, seguida de la administración de la suspensión a través del canal del pezón, utilizando una cánula estéril conectada a una jeringa desechable, que se introdujo parcialmente en el canal del pezón para minimizar el riesgo de lesiones. Una vez completada la infusión, el pezón fue masajeadó suavemente en dirección dorsal para favorecer la distribución de la suspensión en la cisterna del cuarto, y se procedió a la desinfección final con una solución desinfectante a base de yodo al 0,5 % (Schukken et al., 1999).

2.5. Procedimientos de muestreos

Se tomaron muestras de leche de cada cuarto a los 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 y 28 días post infusión (pi). En primera instancia se tomaron 5 mL de leche en viales estériles para análisis bacteriológico. Luego se tomaron aproximadamente 40 mL de leche en tubos tipo Falcon de 50 mL para RCS, evaluación de anticuerpos y citoquinas. Finalmente, se tomaron 40 mL de leche de cada cuarto desafiado en un tubo Falcon estéril, para citometría. Todas las muestras fueron recolectadas en forma aséptica siguiendo procedimientos estándar (Oliver et al., 2004) durante el ordeño de la tarde. Luego del muestreo, los pezones de las vaquillonas se sumergieron en una solución antiséptica conteniendo 0,5% de yodo disponible.

Tabla 9. Esquema de muestreos

Días relativos al desafío	-7	0	1	2	3	4	5	6	7	14	21	28
Muestras leche	RCS	Bac	Bac	Bac	Bac	Bac	Bac	Bac	Bac	Bac	Bac	Bac
	Bac	RCS	RCS	RCS	RCS	RCS	RCS	RCS	RCS	RCS	RCS	RCS
		Acs		Citoq		Citom	Citoq	Citom	Acs	Acs	Acs	
		Citoq		Citom					Citoq	Citom	Citom	
		Citom										

Referencias: RCS (Recuento de células somáticas); Bac (Bacteriología); Acs (Anticuerpos); Citoq (Citoquinas); Citom (subpoblaciones celulares evaluadas por Citometría)

2.6. Evaluación del progreso de la infección y capacidad de protección

Desde el momento de la infusión hasta los 28 días posteriores, cada vaquillona fue monitoreada diariamente con el fin de registrar el estado general, el apetito, la producción de leche y la eventual aparición de signos clínicos compatibles con inflamación de la glándula mamaria.

Además, se llevó a cabo una exploración clínica de las glándulas mamarias, evaluándose tanto el aspecto de la secreción láctea como las características de la glándula, siguiendo una escala clínica adaptada de Middleton et al., (2006) (M0: leche normal sin cambios manifiestos; M1: cambios microscópicos manifiestos (presencia de grumos de distinto color y tamaño) sin inflamación de la GM; M2: cambios manifiestos en la secreción láctea, acompañados de inflamación de la GM). El monitoreo de signos clínicos de inflamación en el cuarto mamario experimental, así como de cambios macroscópicos en la leche, fue realizado mediante evaluaciones diarias durante el período post inoculación. Estos parámetros se consideraron como criterios de alerta para la aplicación de un tratamiento antibiótico inmediato, con el objetivo de priorizar en todo momento la salud y el bienestar de los animales incluidos en el ensayo.

La IIM por *S. aureus* se definió como dos muestras de leche consecutivas o intercaladas con identificación bacteriológica positiva de *S. aureus* (sección 2.7) con aislamiento de un microorganismo con idéntico pulsotipo (PT) (sección 2.8), según las metodologías descritas a continuación.

2.7. Examen bacteriológico

Las muestras de leche se analizaron mediante métodos bacteriológicos estándar (Oliver et al., 2004). Se sembraron 100 µL de leche en placas con agar Columbia suplementado con 5% de sangre bovina, incubando 24 h a 37 °C en aerobiosis. Se revisó el crecimiento a las 24 y 48 h. La identificación fenotípica se basó en morfología colonial, tinción de Gram, prueba de catalasa y coagulasa en tubo con plasma de conejo. La presencia de una colonia coagulasa-positiva fue considerada identificación

positiva. Las muestras con tres o más especies bacterianas distintas (basadas en morfología colonial) fueron consideradas contaminadas. Los aislamientos fueron conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en BHI-glicerol al 20% hasta su uso.

2.8. Caracterización genotípica (PFGE)

La clonalidad de los aislamientos de *S. aureus* recuperados de las muestras de leche se evaluó mediante Electroforesis en campo pulsante (PFGE), según descripciones previas (Camussone et al., 2020). En resumen, se cultivaron los *S. aureus* aislados, así como *S. aureus* 26L, y suspensiones de estos se inmovilizaron en *plugs* (tacos) de agarosa. Sobre ellos se realizó la extracción de ADN genómico, mediante lisis enzimática. El ADN cromosómico se digirió con la endonucleasa de restricción *Sma*I (Promega) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 17 h. y los fragmentos obtenidos se corrieron en un equipo CHEF-DR II (BioRad Laboratories, EE. UU.; Camussone et al., 2020). Los patrones de bandas obtenidos se analizaron mediante la construcción de una matriz binaria donde se asignó "1" a la presencia de banda y "0" a su ausencia. A partir de esta matriz, se calculó la similitud entre aislamientos mediante el coeficiente de Dice y se construyó un dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) en el software R versión 4.5.0. Los aislamientos con $\geq 80\%$ de similitud se consideraron del mismo clon/pulsotipo (PT).

2.9. Recuento de células somáticas en leche.

Las muestras de leche para RCS fueron preservadas con azidol (0,3%), almacenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y analizadas dentro de las 24 h en un laboratorio comercial (Laboratorio Regional de Servicios Analíticos, Esperanza, Argentina) con contador automático (Somacount 300, Bentley Instruments, EE. UU.).

2.10. Tratamiento final de animales infectados

El protocolo de tratamiento de cuartos infectados al final del ensayo consistió en la aplicación de 2 jeringas intramamarias por cuarto de rifaximina/cefacetril (Cefaximin-L, FATRO) cada 12 hs durante 3 días consecutivos. La cepa utilizada mostró susceptibilidad *in vitro* a esta formulación antibiótica.

3. *Evaluación de la respuesta inmune*

3.1. *Respuesta humoral*

3.1.1. *Niveles de IgG específicas a los antígenos vacunales*

La producción de anticuerpos específicos en leche frente a los antígenos recombinantes rFnbpA, rClfA, rAt y rBt se evaluó mediante ensayos de ELISA indirecto para los isotipos IgG, IgG1 e IgG2, siguiendo la metodología descrita por Reidel et al., (2019), con algunas adaptaciones. Inicialmente las muestras de leche fueron desgrasadas mediante centrifugación a 5000 rpm x 30 minutos. Se obtuvieron alícuotas de los sobrenadantes y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

Se emplearon placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), las cuales fueron sensibilizadas con 0,5 μg de cada proteína recombinante por pocillo, diluidas en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6), e incubadas durante 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalizada esta etapa, los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con una solución al 5% p/v de leche de cabra descremada en polvo disuelta en PBS. Posteriormente, se incubó con los sueros de leche, previamente diluidos 1:25 en PBS suplementado con 1% p/v de leche descremada en polvo. Para la detección, se emplearon anticuerpos específicos: anti-IgG bovina (Sigma-Aldrich) y anti-IgG1 bovina (BioRad Laboratories, CA, USA), ambos conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP), y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG2 bovina (Sigma-Aldrich), seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, también conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Inc., EE.UU.). Todas las incubaciones se realizaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h, con lavados intermedios de tres ciclos tras cada paso, utilizando PBS suplementado con Tween-20 al 0,05%, con el fin de eliminar uniones inespecíficas. El revelado se efectuó mediante la adición TMB (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), y la reacción enzimática se detuvo con ácido sulfúrico 0,5 N. Finalmente, la lectura de la DO se realizó a 450 nm en un lector de placas (Infinite F50, Tecan Trading AG, Suiza). Los resultados se expresaron como valores de DO obtenidos para cada muestra.

3.1.2. *Niveles de IgG específica para la cepa *S. aureus* 26L*

Se evaluó también la producción de IgG específica en leche frente a un lisado de *Staphylococcus aureus* 26 L, mediante ensayos de ELISA indirecto, utilizando las mismas muestras de leche descritas previamente. El antígeno utilizado consistió en un lisado bacteriano obtenido mediante sonicación y emulsificación de cultivos de *S. aureus* 26 L. Para el ensayo, se emplearon placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), las cuales fueron sensibilizadas con lisado proveniente de 1×10^9 UFC de *S. aureus* 26 L por pocillo, diluido en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6), e incubadas durante 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalizada esta etapa, los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con una solución de gelatina porcina al 1% p/v

disuelta en PBS. A continuación, se incubó con los sueros de leche previamente diluidos 1/50 en PBS. Para la detección de IgG específica se utilizó el anticuerpo: anti-IgG bovina conjugado a HRP (Sigma-Aldrich). Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C durante 1 h, con lavados intermedios de tres ciclos tras cada paso, utilizando PBS suplementado con Tween-20 al 0,05%, con el fin de eliminar uniones inespecíficas. El revelado se realizó acorde a lo detallado previamente (sección 3.1.1).

3.2. Respuesta celular

3.2.1. ELISA para detección de citoquinas en leche

Las muestras de leche fueron desgrasadas mediante dos centrifugaciones consecutivas (2000 × g, 10 min; 18000 × g, 30 min) a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

La determinación de los niveles de citoquinas se realizó utilizando kits comerciales de ELISA para IL-1β (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU), IL-8, IL-4, IL-17 e IFN-γ (MABtech AB, NackaStrand, Suecia), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Las concentraciones se determinaron en función de curvas estándar generadas con citoquinas recombinantes provistas en los kits, y los resultados fueron expresados en pg/mL.

3.2.2. Análisis poblacional de células somáticas en leche

3.2.2.1. Procedimiento para la extracción de células de leche

Las muestras de leche fueron conservadas en refrigeración hasta su procesamiento, a fin de evitar la adherencia y pérdida de macrófagos. Para el aislamiento celular, se colocaron 25 mL de leche en tubos Falcon de 50 mL, los cuales fueron diluidos en igual volumen de PBS 1X estéril frío. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 400 × g durante 10 minutos a 4 °C. Una vez finalizado este paso, se retiró cuidadosamente la capa de grasa depositada en la parte superior de los tubos con una espátula estéril, evitando que se mezclara con el sobrenadante. El pellet celular obtenido se conservó y el sobrenadante fue eliminado procurando no perturbar el sedimento. El pellet fue resuspendido en 5 mL de PBS 1X estéril mediante pipeteo suave. La suspensión celular se completó a un volumen final de 40 mL con PBS 1X estéril y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones (400 × g, 10 minutos, 4 °C). Este procedimiento de lavado se repitió tres veces, descartando el sobrenadante en cada ciclo. Finalmente, el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS 1X estéril.

La concentración y viabilidad celular fueron determinadas en cámara de Neubauer, utilizando azul de tripán como colorante de exclusión, contabilizando únicamente las células viables o refringentes, que no incorporaron el colorante.

3.2.2.2. Titulación y marcación de células somáticas en leche

Las células somáticas aisladas de leche fueron lavadas con PBS 1X y posteriormente resuspendidas en buffer FACS. A continuación, se procedió a la marcación inmunológica de las células utilizando diferentes anticuerpos monoclonales, de acuerdo con los objetivos específicos del ensayo.

Para la identificación y cuantificación de las poblaciones de células inmunes (linfocitos T CD4+, T CD8+ y granulocitos) se empleó un panel de anticuerpos específicos. Los anticuerpos primarios utilizados incluyeron anti-CD4 y anti-CD8, específicos para la detección de las subpoblaciones de linfocitos T, y el anticuerpo anti-CH183A, dirigido a la población de granulocitos. Es importante señalar que la detección de anti-CH183A se realizó mediante un protocolo de tinción indirecta que requirió la incubación adicional con un anticuerpo secundario anti-IgM. La lista completa de anticuerpos, incluyendo clones, conjugados y fabricantes, se detalla en la Tabla 10. Las diluciones de trabajo fueron optimizadas según las recomendaciones del fabricante y ensayos preliminares: anti-CD4 se utilizó a una dilución 1/20, anti-CD8 a una dilución 1/300, anti-CH183A a una dilución 1/1000 y anti-mouse IgM una dilución a 1/400.

El procedimiento de marcación se realizó íntegramente en frío y en oscuridad, siguiendo los pasos que se detallan a continuación. Se prepararon alícuotas de 1×10^6 células en tubos Eppendorf estériles, se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm y se eliminó el sobrenadante, dejando un pequeño volumen para resuspender el pellet. A cada tubo se le adicionó 25 μ L de la dilución de anticuerpo correspondiente, en buffer FACS, y se incubó durante 30 minutos. En los casos en que se requirió el uso de un anticuerpo secundario, se repitió el proceso de centrifugación, resuspensión e incubación bajo las mismas condiciones.

Tras la incubación, se lavaron las muestras con 500 μ L buffer FACS mediante centrifugación, y las células fueron resuspendidas en buffer FACS suplementado con 1% de formaldehído. La fijación se realizó durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron nuevamente a fin de recuperar las células fijadas y, finalmente, se resuspendieron en 300 μ L de buffer Focusin fluid (Fluido de enfoque, Attune™, Thermo Fisher Scientific). Finalmente, los datos de fluorescencia se adquirieron en el citómetro de flujo (Attune NxT, Life Technology). El análisis de las poblaciones celulares se realizó utilizando el software FlowJo V 10.5.0 (TreeStar Inc., Ashland, USA) y se basó en la utilización del principio de “gating” o delimitación de regiones y en las correspondientes marcas. En la Figura 14 se muestra la estrategia de gating utilizada para el análisis.

Tabla 10. Anticuerpos utilizados para caracterizar poblaciones celulares en leche

Marcador	Tipo / Clon	Conjugado	Fabricante	Catálogo No.
CD4 (Linfocito)	Primario Bovino Monoclonal CC8	PE	Invitrogen	MA528361
CD8 (Linfocito)	Primario Bovino Monoclonal CC63	ALEXA FLUOR® 647	BIORAD	MCA837A6 47
CH138A (granulocitos)	Primario Bovino	S/C	Kingfisher Biotech	WSC0608B- 100
IgM anti Mouse	Policlonal Secundario	PE	Invitrogen	M31504

PE (R-ficoeritrina); S/C Sin conjugado

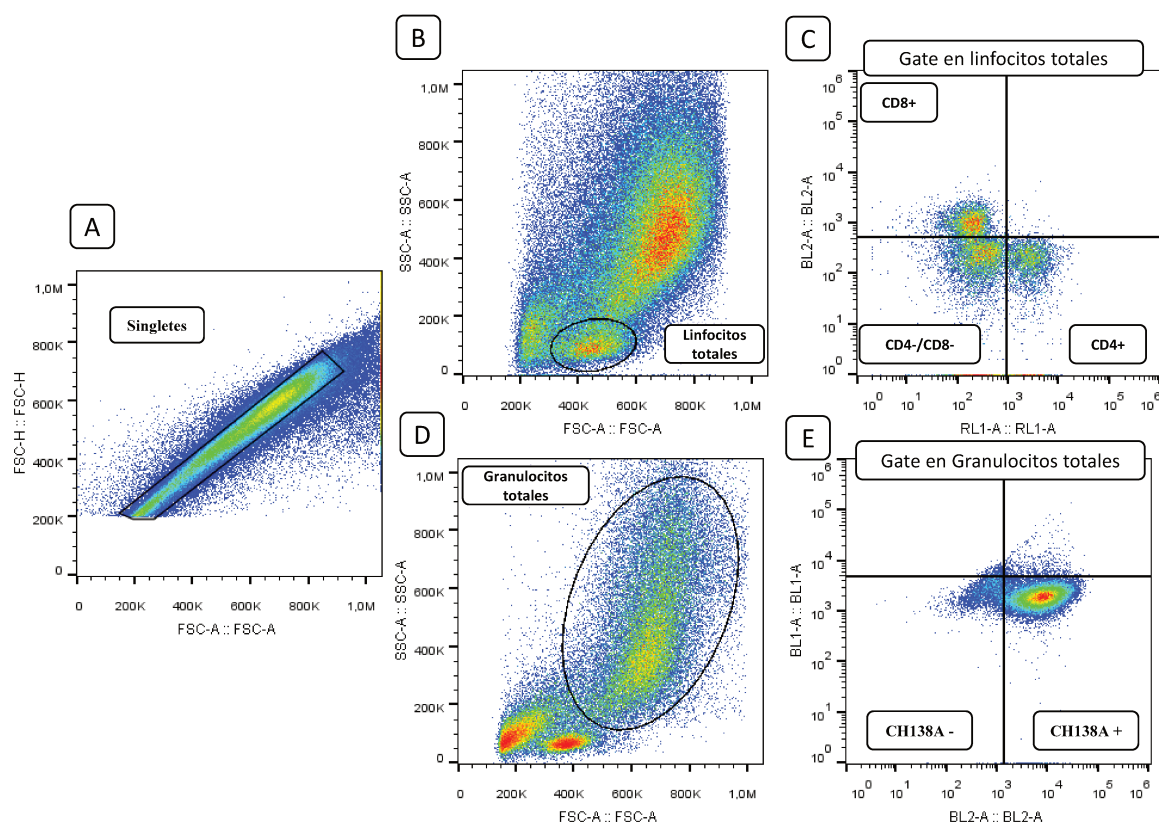


Figura 14. Gráficos representativos correspondientes a la estrategia de gating utilizada para la identificación de subpoblaciones leucocitarias en muestras de leche mediante citometría de flujo. (A) Selección de singletes o células individuales mediante un diagrama FSC-A vs FSC-H. (B) Identificación de linfocitos totales basada en parámetros de tamaño y complejidad celular relativa en un diagrama FSC-A vs SSC-A. (C) Dot plot representativo que muestra la frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8. (D) Identificación de granulocitos totales en un diagrama FSC-A vs SSC-A. (E) Dot plot representativo de la frecuencia de granulocitos mediante la expresión del marcador CH138A. Software FlowJo V 10.5.0 (TreeStar Inc., Ashland, USA).

4. Tratamiento estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com). En primer lugar, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, junto con la prueba de esfericidad para las variables medidas en el tiempo. Debido al incumplimiento de estos supuestos, se emplearon métodos no paramétricos y los resultados se reportaron como mediana \pm rango intercuartil (RI).

Para el análisis de medidas repetidas a lo largo del tiempo dentro de cada grupo, se aplicó la prueba de Friedman para evaluar las tendencias temporales globales. Las comparaciones de variables entre los diferentes grupos de tratamiento en cada punto temporal se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para identificar diferencias específicas entre pares. En todos los casos, se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Las diferencias en la proporción de cuartos desafiados infectados entre grupos se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

5. Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados conforme a la "Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en la investigación y docencia" (FASS, 2010), y aprobados por el Comité de Ética y Seguridad del Centro Regional Santa Fe del INTA (CICUAE, N.º 21-0120; 6 de junio de 2021), así como por el Comité de Ética y Seguridad en la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (CE2021-35; 16 de marzo de 2021).

RESULTADOS

El presente capítulo describe el desafío experimental realizado para evaluar la capacidad protectora de las formulaciones vacunales seleccionadas frente a una infección intramamaria experimental por *Staphylococcus aureus*. Para esta etapa se emplearon dos formulaciones basadas en liposomas catiónicos (Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec) previamente caracterizadas en el capítulo anterior, e identificadas como las más promisorias por su capacidad para inducir respuestas humorales y celulares sostenidas frente a los antígenos recombinantes evaluados. Las vaquillonas inmunizadas recibieron un refuerzo preparto administrado aproximadamente seis meses después de la tercera dosis (un mes antes de la fecha probable de parto), con el objetivo de reactivar la memoria inmunológica antes de la lactancia. El grupo control estuvo constituido exclusivamente por animales no inmunizados, lo que permitió establecer comparaciones directas tanto en la respuesta inmune como en los parámetros asociados a la infección.

1. Respuesta inmune a la inmunización preparto

1.1. Niveles de IgG específica contra antígenos recombinantes en suero

Tras la aplicación del refuerzo preparto en las vaquillonas preñadas, se evidenció una respuesta humoral diferencial entre los grupos inmunizados y el grupo control no inmunizado frente a los antígenos recombinantes evaluados (Figura 15). Las comparaciones realizadas a lo largo del tiempo se realizaron utilizando la prueba de Friedman. Ambos grupos inmunizados (Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec) presentaron un incremento marcado en los niveles séricos de IgG específicas para rAt, rBt y rClfA ($p < 0,05$). Estos niveles se sostuvieron hasta los 30 días post inoculación, periodo que coincidió con las fechas en las que ocurrieron los partos de las vaquillonas (entre los días 15 y 30).

Las diferencias estadísticas entre grupos en puntos de tiempo específicos (días 0, 15 y 30) se analizaron utilizando la prueba de Kruskal–Wallis, seguida de la corrección de Dunn para comparaciones múltiples. Al momento de la aplicación del refuerzo, el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec, evidenció niveles significativamente superiores que el control sin inmunizar para rAt, rBt y rClfA ($p < 0,05$) mientras que el grupo Lip+Man+Rec solo para rAt ($p < 0,05$). Posteriormente Los niveles de anticuerpos frente a rAt, rBt y rClfA fueron significativamente superiores en los grupos inmunizados, con respecto al control con distintos grados de significancia estadística en ambos tiempos evaluados (15 y 30 días) ($p < 0,05$ - $p < 0,001$) (Figura 15A–C). En contraste, la respuesta dirigida contra rFnbpA mostró incrementos más moderados, alcanzando solo diferencias

significativas respecto del grupo control únicamente en el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec a los 15 ($p < 0,05$) y 30 días ($p < 0,01$) (Figura 15D) post refuerzo.

Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas en los niveles de IgG entre los días 15 y 30 post inmunización, para ambos grupos inmunizados, lo que indica una respuesta humoral sostenida durante la transición hacia el parto, etapa crítica para la susceptibilidad a infecciones intramamarias. En todos los casos, los animales del grupo control mantuvieron valores basales de IgG, confirmando la ausencia de respuesta humoral específica en ausencia de inmunización.

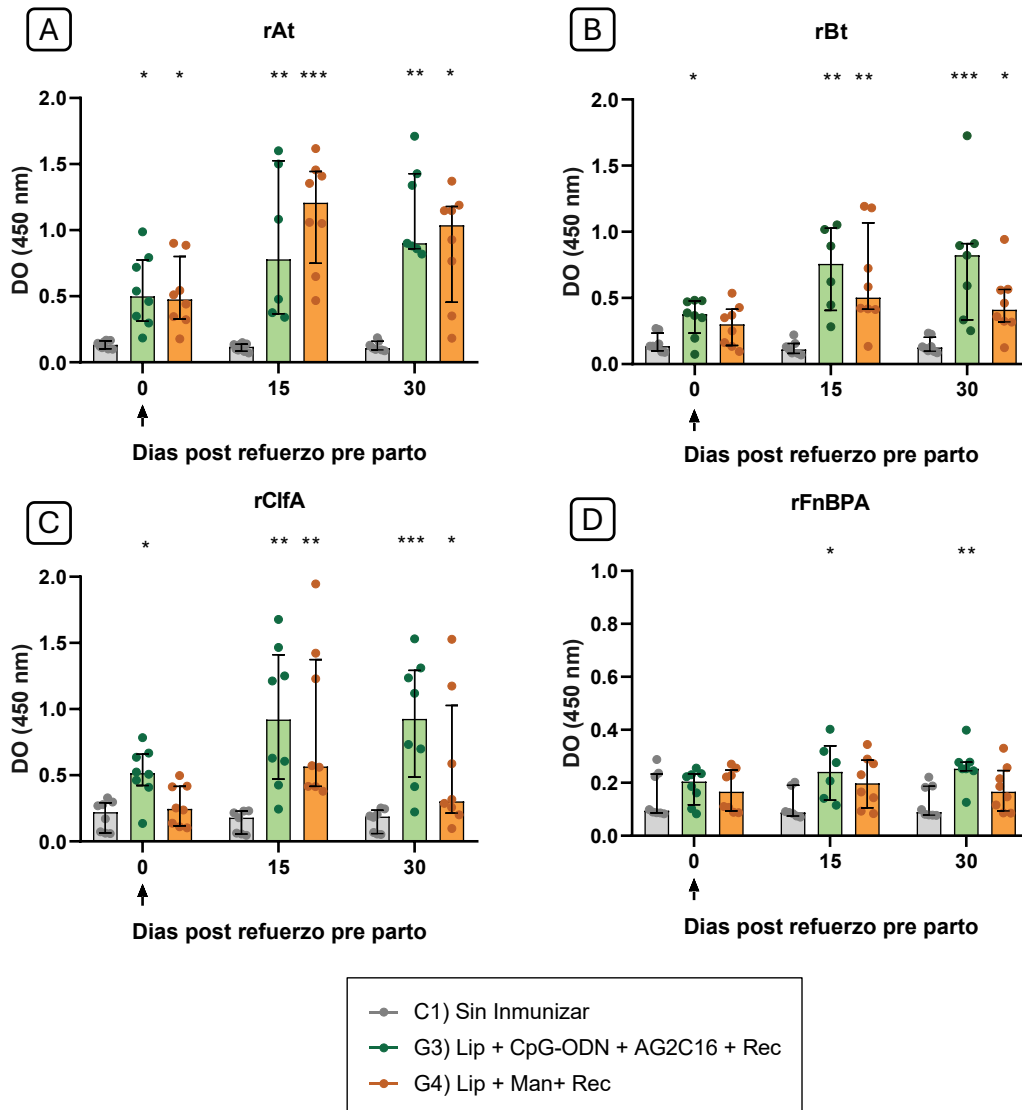


Figura 15. Niveles séricos de IgG específicas frente a los antígenos recombinantes rAt, rBt, rClfA y rFnBPA determinados tras la aplicación del refuerzo preparto en vaquillonas pertenecientes a los grupos experimentales. Los sueros se evaluaron en una dilución de 1/1000. La flecha en el grafico indica el momento de inoculación al pre parto. Los datos se expresan como mediana ± rango Inter cuartil (RI). La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la prueba de Dunn. $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**) se consideraron diferencias significativas respecto al grupo no inmunizado.

1.2. Niveles de IgG1 e IgG2 específica contra antígenos recombinantes en suero.

Asimismo, se evaluaron los niveles séricos de las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 específicas para los cuatro antígenos recombinantes, a los 15 días posteriores a la aplicación del refuerzo preparto (Figura 16). La respuesta humoral de tipo IgG1 evidenció una clara estimulación en los animales pertenecientes a los grupos inmunizados. En comparación con el grupo control, el grupo Lip+Man+Rec alcanzó diferencias estadísticamente significativas para todos los antígenos (rAt, rClfA y rFnbpA $p < 0,05$; rBt $p < 0,01$). En el grupo Lip+ODN-CpG+AG2C16+Rec, los aumentos resultaron significativamente superiores al grupo control solo para los antígenos rAt ($p < 0,05$) y rClfA ($p < 0,05$).

En relación con la subclase IgG2a, ambas formulaciones inmunogénicas indujeron un incremento significativo en los niveles séricos de anticuerpos específicos frente a los antígenos rAt, rBt y rClfA, en comparación con el grupo no inmunizado ($p < 0,01$) (Figura 16). No se detectó producción de IgG2 específica frente al antígeno rFnbpA en ninguno de los grupos inmunizados. En el grupo control, los niveles de esta inmunoglobulina se mantuvieron en valores basales para todos los antígenos evaluados.

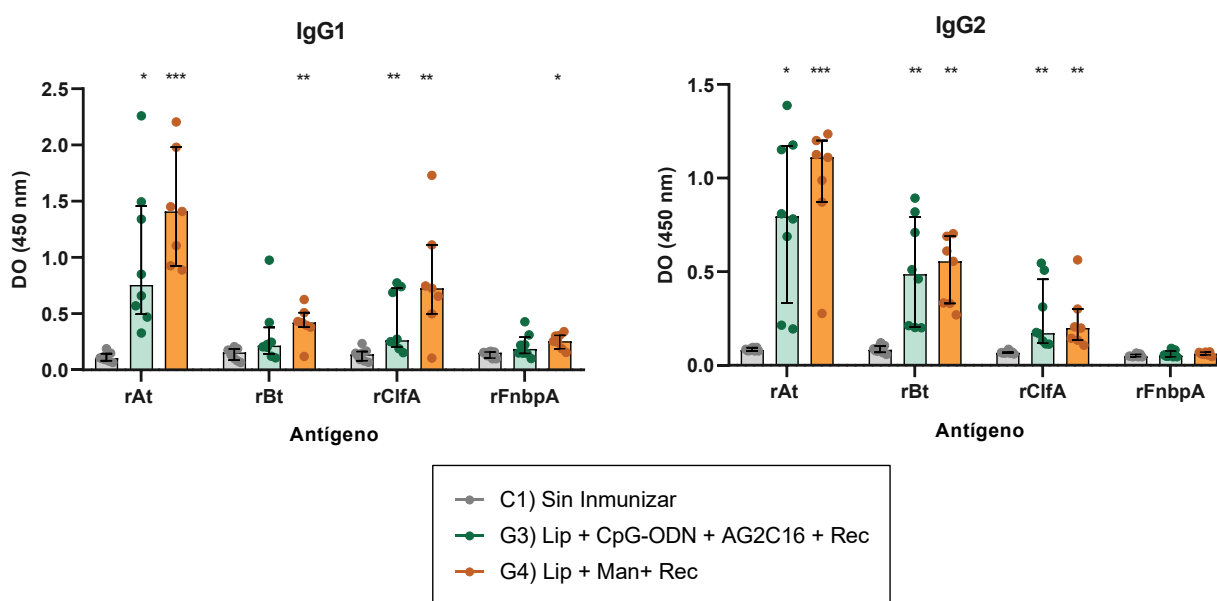


Figura 16. Niveles séricos de IgG1 e IgG2 específicas frente a los antígenos recombinantes rAt, rBt, rClfA y rFnbpA, determinados 15 días posteriores a la aplicación del refuerzo preparto en vaquillonas de los grupos experimentales. Los sueros se probaron en una dilución de 1/1000 para IgG1 y 1/500 para IgG2. Las barras representan la mediana \pm RI. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de comparaciones múltiples de Dunn. Diferencias significativas respecto al grupo control sin inmunizar: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

2. Selección de una cepa de *S. aureus* para el modelo de infección intramamaria subclínica.

Previo al estudio de infección experimental en los animales seleccionados, se realizó un ensayo piloto, en el cual se evaluó el comportamiento de dos cepas distintas de *Staphylococcus aureus*. Para ello, una vaca de 5 lactancias se inoculó en un cuarto con 100 UFC de la cepa 26L y otro con la misma cantidad de la cepa 9L. El monitoreo de los cuartos mamarios post infección evidenció diferencias marcadas en la dinámica de infección entre ambas (Figura 17). La cepa *S. aureus* 26L fue capaz de establecer una infección subclínica controlada, sin provocar alteraciones macroscópicas en la leche ni inflamación de la glándula mamaria durante los primeros días post-infección (dpi) (escala clínica M0), demostrando su capacidad de generar una infección subclínica a la concentración de inóculo establecida. En este caso, se recuperaron bacterias en leche a partir del cuarto dpi (0.69 Log¹⁰ UFC/mL) y se observó un incremento moderado de RCS (5.93 Log₁₀ cel/mL) y posterior disminución hacia el día 7 pi. Por el contrario, en el cuarto inoculado con la cepa *S. aureus* 9L, se observó el recupero bacteriano a partir del día 2 pi (1.51 Log₁₀ UFC/mL) y un aumento del RCS a partir del día 2 pi (5.96 Log₁₀ cel/mL), que continuó elevándose progresivamente hasta el día 7 pi (2.69 Log₁₀ UFC/mL, 7.22 Log₁₀ cel/mL), momento en que se evidenciaron cambios macroscópicos en la leche, a través de la presencia de grupos junto con inflamación del cuarto afectado (escala clínica M2). En ese momento se detuvo el ensayo y se abordó el tratamiento del animal.

En función de estos hallazgos, se seleccionó la cepa *S. aureus* 26L para el ensayo de desafío experimental.

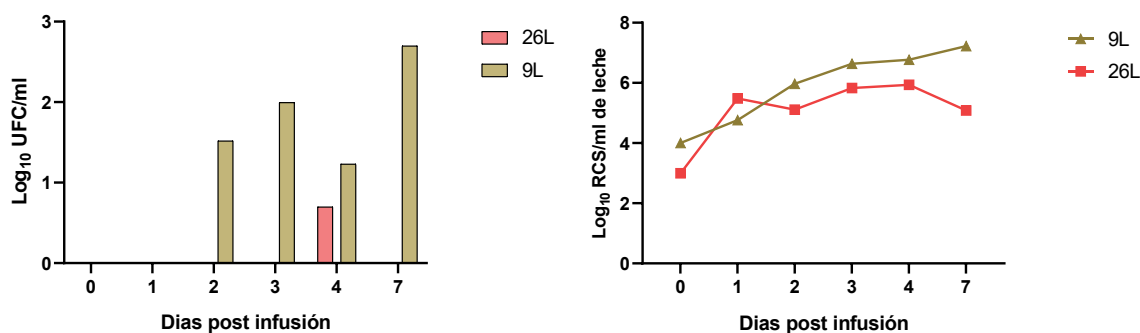


Figura 17. Evolución temporal de las UFC y RCS en dos cuartos distintos de un mismo animal inoculados con dos cepas diferentes de *S. aureus*.

3. Desafío experimental

3.1. Monitoreo de la infección

Un total de 42 cuartos mamarios (14 cuartos por grupo) recibieron una inoculación intramamaria de *S. aureus* 26L, en un volumen final de 1 mL. De acuerdo con los recuentos de células viables del inóculo preparado para cada jornada experimental, la dosis de desafío se estimó entre 100 y 150

UFC/mL. Debido a que los desafíos se realizaron en múltiples instancias experimentales, y que un mismo inóculo en ocasiones se utilizó para inocular varios animales, se reporta el rango de concentración en lugar del recuento individual por cuarto. Asimismo, no se detectó crecimiento bacteriano en la solución salina de PBS utilizada para los cuartos control, confirmando la esterilidad de ésta.

Tras la infusión intramamaria, no se observaron signos clínicos en ninguno de los cuartos mamarios desafiados a lo largo del ensayo. Durante todo el período de monitoreo (28 dpi), no se registraron alteraciones locales en la glándula mamaria, tales como enrojecimiento, inflamación o sensibilidad al tacto. De igual modo, la apariencia macroscópica de la leche permaneció sin cambios, sin evidencias de coágulos o grumos (escala clínica M0). Tampoco se detectaron cambios macroscópicos en la leche ni signos de inflamación en los cuartos sin desafiar, en ninguno de los tiempos evaluados.

3.2. Examen bacteriológico y tasa de infección

Se realizó el aislamiento e identificación bacteriana a partir de muestras de leche de los cuartos mamarios desafiados (CD) y controles en distintos tiempos post-infusión. El recuento de UFC compatibles con *S. aureus*, realizado desde el día 0 hasta el día 28 pi, se muestra en la Figura 18 como carga bacteriana (Log_{10} UFC/mL).

De los 42 cuartos desafiados, 41 desarrollaron IIM confirmada por *S. aureus*, definida según los criterios establecidos (dos muestras consecutivas o intercaladas con identificación bacteriológica positiva y aislamiento de microorganismos con idéntico PT). El análisis por PFGE reveló que 40 de estos 41 cuartos presentaron aislamientos con PT idéntico al de la cepa inoculada (26L) (Anexo II), confirmando que la infección correspondía al desafío experimental. Un cuarto adicional desarrolló IIM por *S. aureus*, pero con un PT diferente al de la cepa 26L. El cuarto restante (1/42) presentó una infección por *Staphylococcus coagulasa-negativo*. Dado que estos dos últimos cuartos no correspondieron a infecciones establecidas por la cepa del desafío (26L), fueron excluidos de los análisis posteriores, resultando en 40 cuartos con IIM confirmada por *S. aureus* 26L incluidos en el análisis (Tabla 11).

Se observó un comportamiento de excreción intermitente del patógeno, con recuperación inconsistente en la leche de algunos cuartos. Mediante la prueba de Friedman para medidas repetidas, se detectaron diferencias globales entre tratamientos ($p < 0.05$). En general, en los grupos inmunizados se evidenció una tendencia hacia cargas bacterianas más elevadas en comparación con el grupo control sin inmunizar. El análisis *post-hoc* mostró diferencias significativas entre el grupo sin inmunizar y Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec ($p = 0.0214$), pero no entre el grupo sin inmunizar y Lip+Man+Rec ($p = 0.1325$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento bacteriano entre ambos grupos inmunizados. Al analizar en detalle el recuperado bacteriano

en leche punto por punto, utilizando la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la corrección de Dunn, el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec evidenció dos picos similares al día 1 y al día 5 pi, siendo este último levemente superior, con una media de 3.10 Log₁₀ UFC/ml. Los recuentos fueron significativamente superiores en el día 1 $p < 0.05$ y en el día 5 $p < 0.001$. A partir de este último se observa una disminución progresiva en los días posteriores hasta el día 21 pi donde nuevamente aumenta. A lo largo del seguimiento, se registraron en este grupo algunos valores individuales muy superiores a la media, lo que contribuyó a una mayor dispersión en los datos. Por su parte, el grupo Lip+Man+Rec presentó los recuentos más elevados en los días 1 y 4 pi, alcanzando en este último una media de 2,79 Log₁₀ UFC/ml, aunque sin diferencias significativas respecto del control. Posteriormente, los recuentos en este grupo continuaron con una disminución progresiva, con un incremento transitorio observado el día 14 (2,18 Log₁₀ UFC/ml) y alcanzaron valores mínimos hacia el día 28 pi (1.25 Log₁₀ UFC/ml). El grupo control exhibió los recuentos bacterianos más bajos durante los primeros días pi, con un valor medio de 1,80 Log₁₀ UFC/mL en el día 1 pi. Posteriormente, se observó un leve incremento a partir del día 3 pi, alcanzando un máximo el día 4 de 2,03 Log₁₀ UFC/mL, seguido de una disminución transitoria en el día 5 pi y un nuevo aumento en el día 6 pi (1,93 Log₁₀ UFC/mL). A partir de ese momento, los recuentos tendieron a estabilizarse, con valores cercanos a 1,5 Log₁₀ UFC/mL hacia el día 28 pi. Al final del período de observación se evidenció una disminución general de los recuentos bacterianos en todos los grupos, junto con una menor dispersión de los datos en comparación con los días previos.

El análisis microbiológico de los cuartos controles (sin desafiar) no mostró crecimiento bacteriano, en ninguno de los tiempos evaluados.

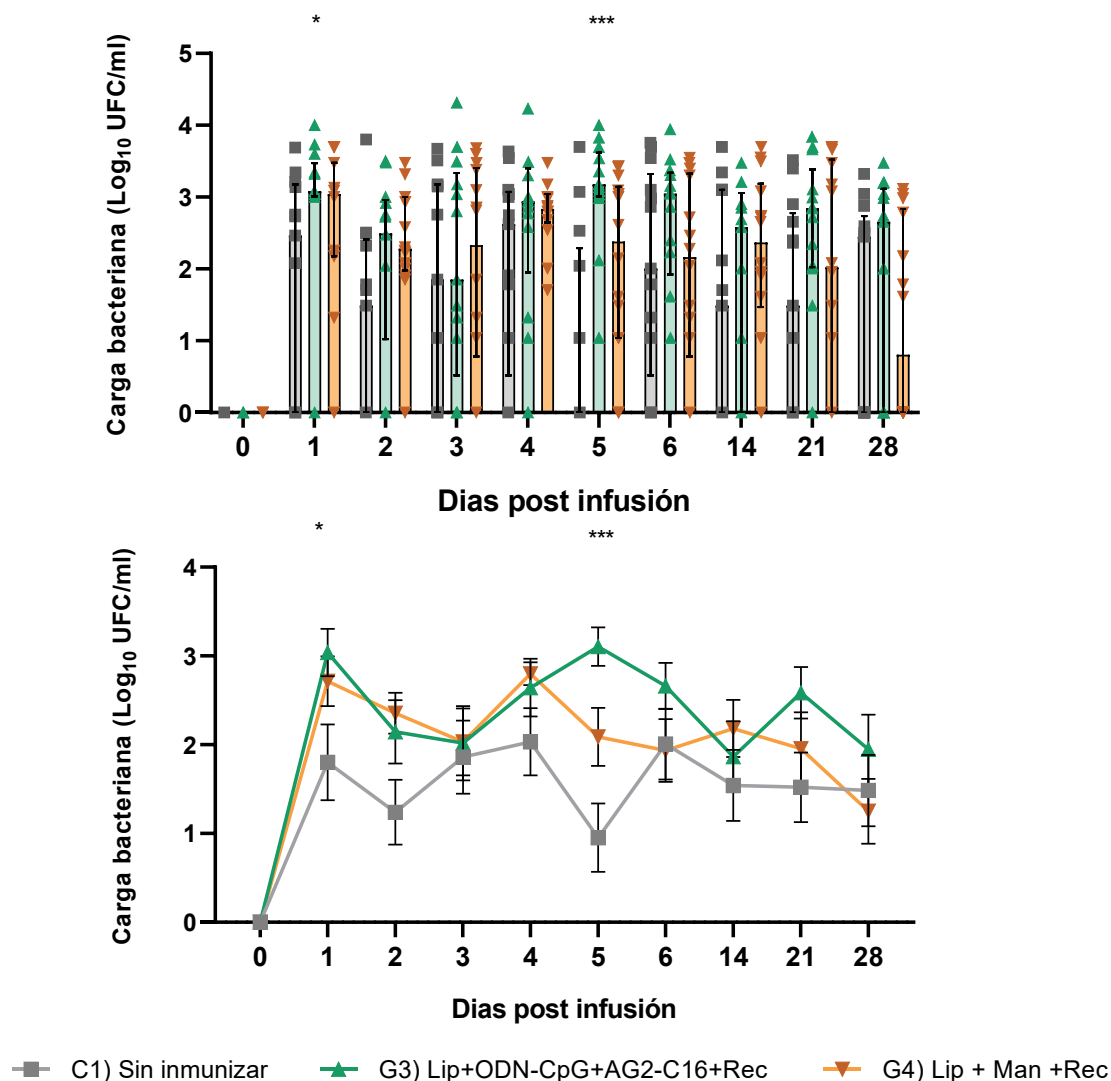


Figura 18. Carga bacteriana en los cuartos mamarios tras desafío experimental con la cepa de *S. aureus* 26L. A) Valores individuales de Log₁₀ de UFC/ml, se presenta mediana ± RI; B) Cinética de la carga bacteriana expresada como media ± EEM en Log₁₀ UFC/ml. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de comparaciones múltiples de Dunn. Las diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control en puntos temporales específicos se señalan con (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Los resultados del examen bacteriológico permitieron determinar la tasa de infección en los CD evaluadas al final del periodo de seguimiento (día 28 pi) (Tabla 11).

La administración de las formulaciones vacunales no resultó en una protección significativa contra el desafío experimental. El grupo Lip+Man+Rec (G4) presentó la menor tasa de infección (50,0%; 7/14 CD) en comparación con el grupo control (53,84%; 7/13 CD), aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística (test exacto de Fisher, $p > 0,999$). Por el contrario, el grupo Lip+CpG-ODN+AG2-C16+Rec (G3) mostró la mayor tasa de infección (69,2%; 9/13 CD), sin diferencias significativas respecto al control ($p = 0,688$). La comparación directa entre ambos grupos

inmunizados (G4 vs G3) no evidenció diferencias significativas en la incidencia de infección ($p = 0,44$).

Tabla 11. Aislamiento bacteriológico y tasa de infección por *Staphylococcus aureus* 26L al final del período de seguimiento experimental (Día 28 post inoculación). Se muestra el número total de cuartos mamarios desafiados (CD) por grupo, y el número y porcentaje de cuartos que se mantuvieron infectados al finalizar el período de desafío.

Grupo Experimental	Nº total de CD	Nº CD Infectadas día 28	Porcentaje de Infección (%) día 28
Sin Inmunizar (C1)	13	7	53.84
Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec (G3)	13	9	69.2
Lip+Man+Rec (G4)	14	7	50

3.3. Recuento de células somáticas (RCS)

En la Figura 19 se muestra la evolución del RCS en leche tras el desafío intramamario en los diferentes grupos experimentales. Antes del desafío, todos los cuartos mamarios de los animales inmunizados y control presentaban menos de 100.000 células/mL. En general, se observó un aumento del RCS a partir del día 1 pi, con un grado considerable de variabilidad, en todos los grupos experimentales. Particularmente, en el grupo control sin inmunizar se observó un incremento inicial del RCS a partir del día 1 pi, alcanzando un pico hacia el día 4 pi (5,57 Log₁₀ cel/mL). Posteriormente, los valores disminuyeron progresivamente hasta el día 14 donde se observó un aumento (5,30 Log₁₀ cel/mL), para luego seguir disminuyendo y estabilizándose en valores cercanos a 5 Log₁₀ cel/mL hacia el final del período de seguimiento. El grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec mostró una tendencia a registrar valores de RCS ligeramente superiores al control durante la mayor parte del seguimiento, con una notable dispersión entre individuos, evidenciando valores más elevados al día 2 pi y un pico máximo a los 6 días pi (5.70 Log₁₀ cel/mL). Por su parte, el grupo Lip+Man+Rec presentó RCS con tendencia similar a la observada para Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec hasta el día 5 pi, arrojando valores máximos el día 2 pi (5.78 Log₁₀ cel/mL), para luego disminuir en días posteriores con una evolución temporal con tendencia más estable. A pesar de esta tendencia, el análisis global (no paramétrico de medidas repetidas mediante la prueba de Friedman) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0,05$). El análisis en detalle del RCS punto por punto, utilizando la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la corrección de Dunn evidencia que el RCS en el día 6 pi del grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec fue significativamente superior respecto al control sin inmunizar ($p < 0,05$). En conjunto, los datos muestran que todos los grupos

experimentales desarrollaron un aumento del RCS tras el desafío intramamario, seguido de una tendencia a la estabilización.

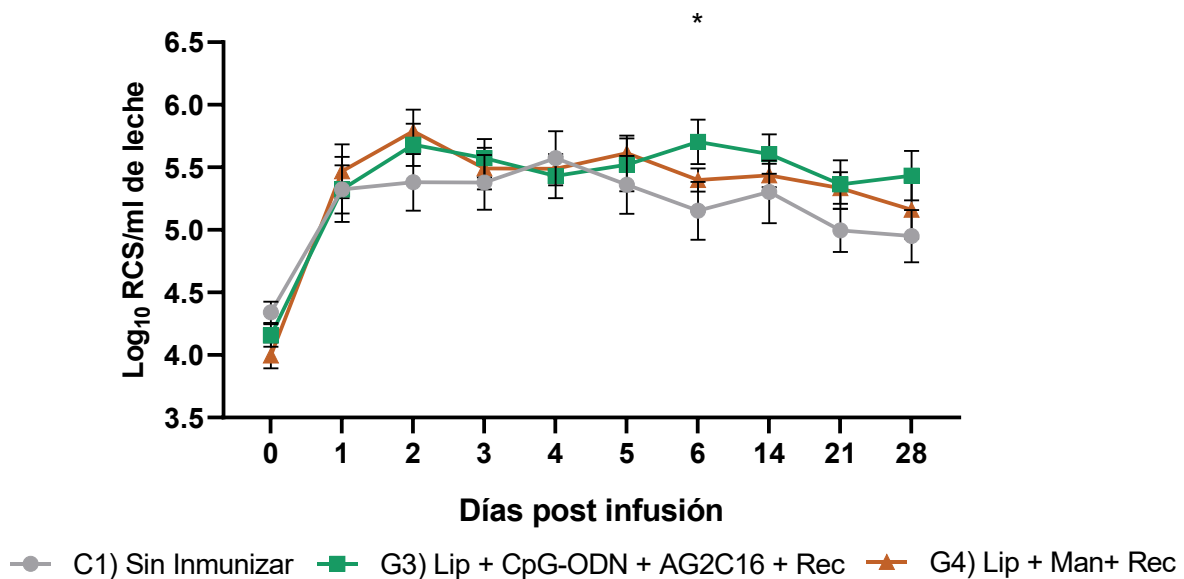


Figura 19. Recuento de células somáticas por mililitro (RCS/ml) en muestras de leche provenientes de cuartos mamarios inoculados con la cepa de *S. aureus* 26L en distintos tiempos post infección (pi) en animales previamente inmunizados y controles. Los datos se presentan como medias \pm EEM Log₁₀ RCS/mL. Las diferencias significativas identificadas entre los grupos C1 vs G3 en puntos temporales específicos, utilizando la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la corrección de Dunn, se señalan con (* $p < 0,05$).

4. Evaluación de la respuesta inmune post desafío.

4.1. Respuesta humoral en leche.

4.1.1. Respuesta de IgG específica contra antígenos recombinantes.

En la Figura 20 se presentan los niveles de IgG específicas en leche de cuartos mamarios desafiados frente a los cuatro antígenos vacunales de *S. aureus* tras la infusión intramamaria. En cuanto al análisis global, los grupos inmunizados (Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec) exhibieron niveles de IgG notablemente superiores en comparación con el grupo control no inmunizado (C1), con diferencias estadísticamente significativas a lo largo de todo el período de análisis para los antígenos rAt, rBt y rClfA ($p < 0,05$). En cuanto al análisis semanal, ambos grupos vacunados mostraron niveles de IgG específica significativamente superiores a los del control, tanto en el momento del desafío (día 0 pi, aproximadamente 60 días desde el refuerzo preparto), como en el resto de los días evaluados, para los antígenos rAt, rBt y rClfA. En el caso del antígeno rFnbpA, se observó un aumento significativo de los anticuerpos específicos solo en el grupo Lip+Man+Rec durante los días 0 ($p < 0,01$), 7 pi ($p < 0,05$), con respecto al control sin inmunizar. Posteriormente, los niveles tendieron a disminuir en ambos grupos, aunque permanecieron por encima de los valores

basales observados en el control sin inmunizar. Los distintos grados de significancia para cada antígeno en cada tiempo se observan en la Figura 20.

Durante el período de estudio, no se observó un efecto estimulador en la producción de IgG específica frente a los antígenos vacunales en leche como consecuencia del desafío intramamario, manteniéndose los niveles detectados sin variaciones significativas atribuibles a la exposición experimental. Si bien en algunos puntos temporales se detectaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el día 0 pi, estas correspondieron a una disminución progresiva de los niveles basales y no a un aumento asociado a la exposición experimental.

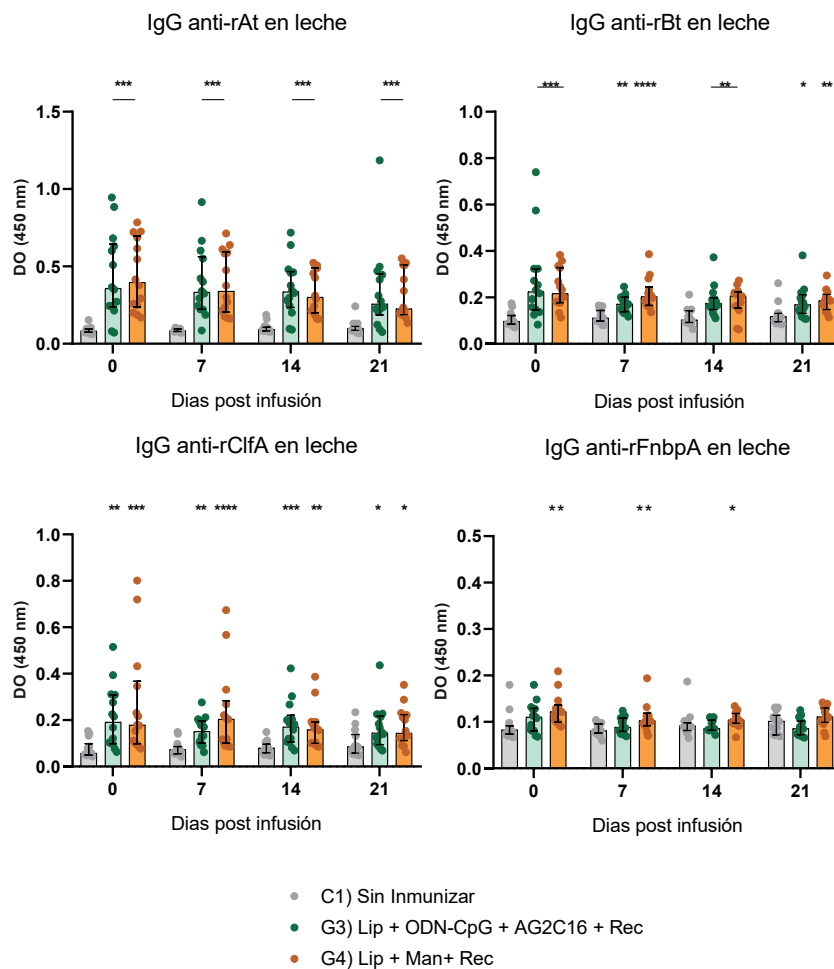


Figura 20. Niveles de IgG específicas en leche frente a los antígenos recombinantes rAt, rBt, rClfA y rFnbpA determinados durante el desafío experimental con *Staphylococcus aureus* 26L. Las leches se probaron en una dilución fija de 1/25. Los datos se expresan como mediana \pm RI. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la prueba de Dunn. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ se consideraron diferencias significativas respecto del grupo no inmunizado.

4.1.2. Evaluación de subclases de IgG específica recombinantes.

Se evaluaron los niveles de las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 en leche los días 0 y 7 pi para los cuatro antígenos recombinantes. Los resultados de IgG1 se presentan en la Figura 21A, mientras que los de IgG2 en la Figura 21B. Los animales inmunizados del grupo Lip+Man+Rec mostraron niveles de IgG1 significativamente más altos que el grupo sin inmunizar para todos los antígenos, tanto en el día 0 como el 7 ($p < 0,01 - p < 0,0001$) mientras que en el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec solo se observaron niveles significativamente superiores para rAt ($p < 0,0001$) y rFnbpA ($p < 0,05$), en ambos tiempos evaluados.

No se observó un aumento significativo en los niveles de IgG1 tras el desafío intramamario al comparar el día 0 pi con el día 7 pi ($p > 0,1$), indicando que la exposición experimental a *S. aureus* 26L no potenció la respuesta preexistente de esta subclase en la glándula mamaria.

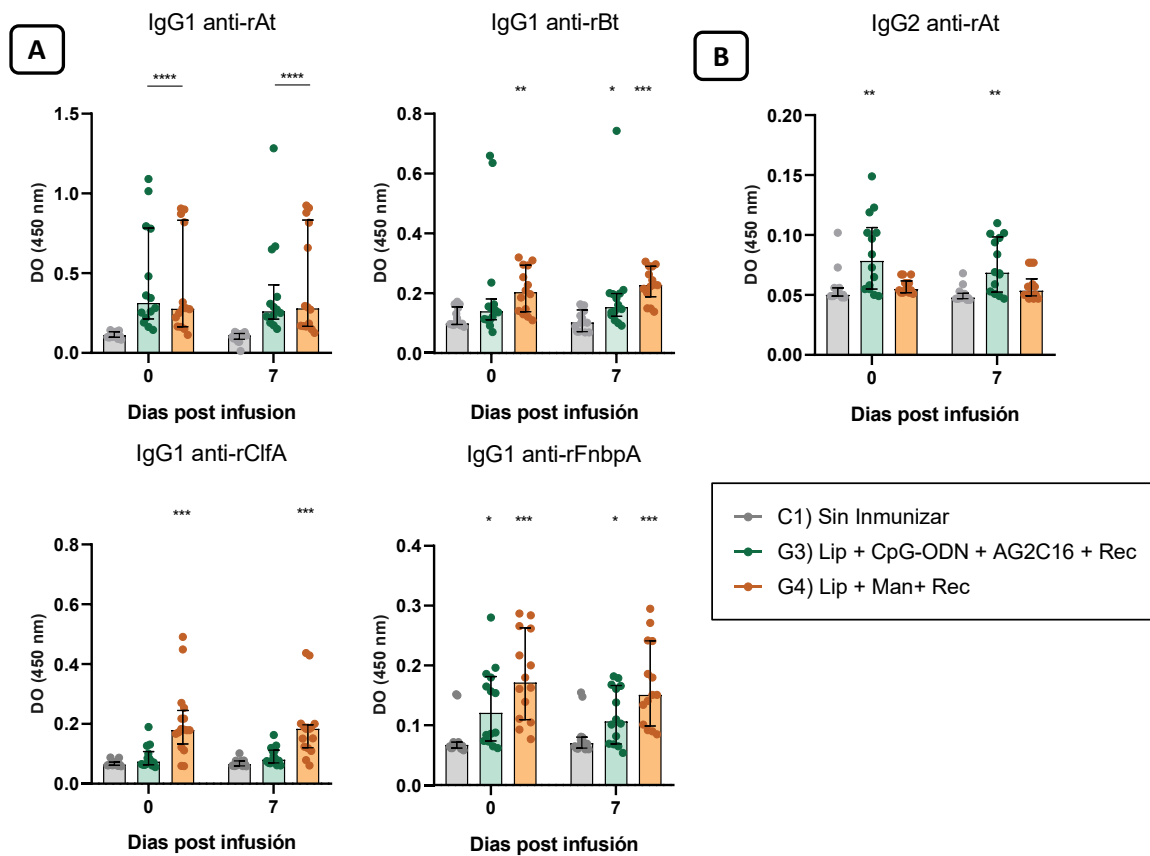


Figura 21. A) Niveles de IgG1 en leche específicos a los antígenos recombinantes rAt, rBt, rClfA y rFnbpA, **B)** IgG2 para rAt, determinados a los 0 y 7 días desde el inicio del desafío experimental con *Staphylococcus aureus* 26L. Las leches se evaluaron en una dilución fija de 1/25. Las barras representan la mediana ± RI. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la prueba de Dunn. Diferencias significativas respecto del grupo control sin inmunizar: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

En cuanto a la subclase IgG2 (Figura 21B), y a diferencia de lo observado para IgG1, no se detectaron niveles específicos en leche frente a los antígenos rBt, rClfA y rFnbpA en ninguno de los grupos evaluados, tanto en el día 0 como en el día 7 pi. Solo para el antígeno rAt se observó una respuesta de IgG2 significativamente superior en los animales inmunizados con Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec, respecto al control no inmunizado ($p < 0,01$). En conjunto, estos resultados indican que la inmunización con ambas formulaciones generó una respuesta humoral local en glándula mamaria predominantemente mediada por IgG1 al momento del desafío experimental (60 días posteriores al refuerzo y aproximadamente 30 días posparto), la cual no se vio incrementada tras la exposición experimental a *S. aureus* 26L.

4.1.3. Niveles de IgG específica contra el lisado de *S. aureus* 26L

El análisis de los niveles de IgG total específica para el lisado de *S. aureus* 26 L se observa en la Figura 22. Los valores de DO correspondientes a los distintos grupos experimentales se mantuvieron cercanos a los niveles basales a lo largo del período de evaluación. Se observó únicamente un incremento leve y transitorio el día 7 pi, para el grupo control sin inmunizar y el grupo Lip+Man+Rec, mientras que el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec mostró una tendencia decreciente estable. Posteriormente, los niveles de IgG específica disminuyeron progresivamente, alcanzando al final del ensayo valores similares o incluso inferiores a los registrados al día 0 pi. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos analizados ($p > 0,05$), lo que sugiere que el desafío experimental indujo una respuesta humoral limitada frente a la cepa infundida.

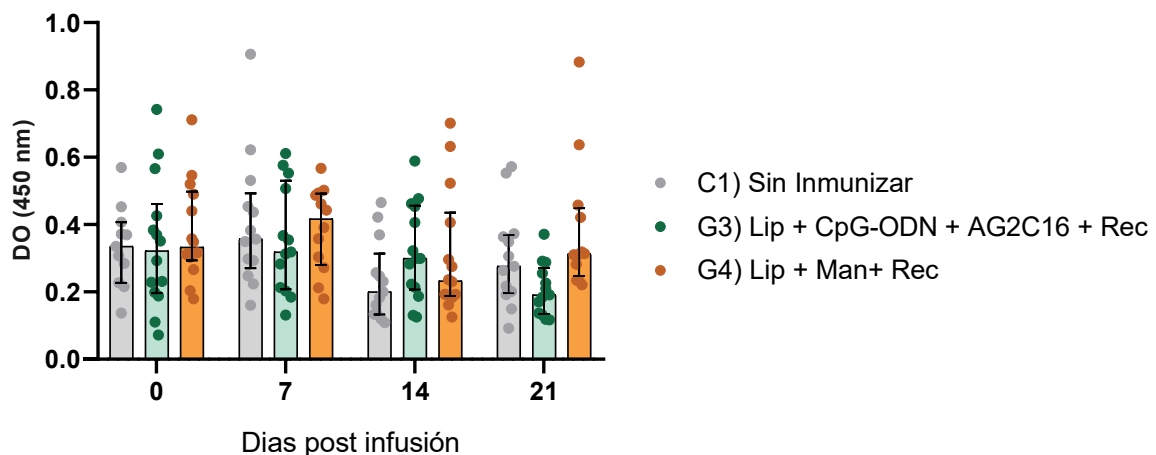


Figura 22. Niveles de IgG total específica en muestras de leche frente al lisado de *Staphylococcus aureus* 26 L, determinados mediante ELISA indirecto. Los resultados se expresan mediana \pm RI y corresponden a los distintos grupos experimentales a lo largo del período de evaluación post-infusión. Las leches se evaluaron en una dilución fija de 1/50.

4.2. Respuesta inmune celular en leche

4.2.1. Evaluación de citoquinas

Se evaluaron los niveles de distintas citoquinas en leche desde el inicio del desafío, día 0, hasta el día 7 pi. En la Figura 23 se presentan los niveles de IL-8 en la leche de los cuartos mamarios de cada animal tras el desafío intramamario con *S. aureus*. En el día 0, los niveles se mantuvieron bajos y comparables entre todos los grupos experimentales. En el día 2 pi se registró un incremento en las concentraciones de IL-8 en los grupos inmunizados, siendo este aumento significativo en el grupo Lip+Man+Rec respecto al grupo control C1 ($p < 0,05$). El grupo Lip+ODN-CpG+AG2C16+Rec presentó valores intermedios, sin diferencias significativas frente al resto de los grupos. En este punto se observó una marcada variabilidad individual, con algunos animales que presentaron valores superiores a la mediana en los tres grupos. En el día 5 pi se observó una tendencia general a la disminución de los niveles de IL-8 en todos los grupos, aunque persistió la variabilidad interindividual, con algunos animales que mantuvieron concentraciones elevadas. Para el día 7 pi, las concentraciones de IL-8 continuaron disminuyendo en todos los grupos, sin observarse diferencias significativas entre ellos, alcanzando valores similares a los registrados antes del desafío.

Además de IL-8, se evaluaron los niveles de otras citoquinas proinflamatorias y reguladoras, incluyendo IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-4 e IL-1 β . En ninguno de los grupos experimentales se detectaron incrementos apreciables en la concentración de estas citoquinas durante el período de muestreo. Los valores registrados se mantuvieron bajos y, en la mayoría de los casos, próximos al límite inferior de detección del kit empleado, sin variaciones entre los distintos tiempos post-infusión ni entre grupos.

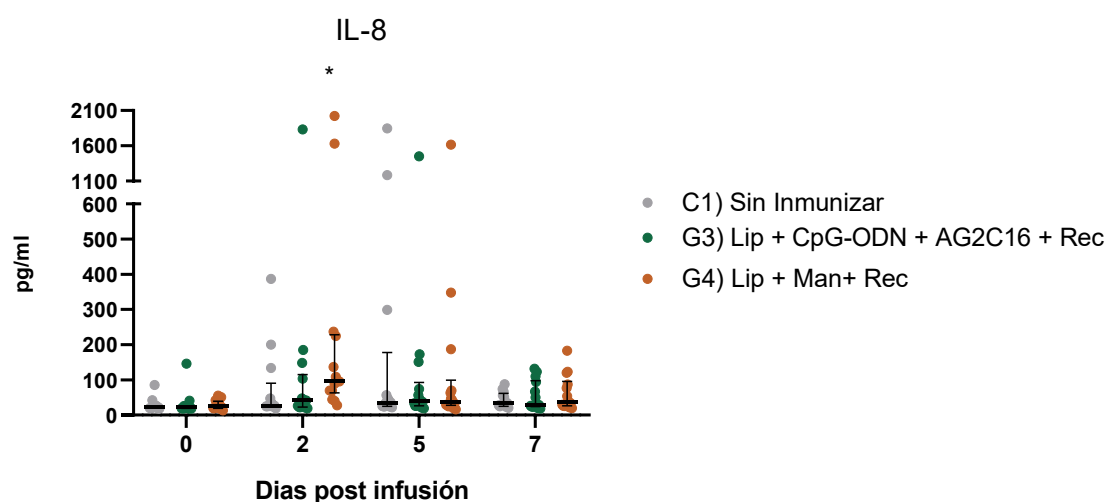


Figura 23. Niveles de IL-8 en la leche de los cuartos mamarios de cada animal tras el desafío intramamario con *Staphylococcus aureus* 26L. Se representan valores individuales y mediana \pm RI. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal–Wallis para las comparaciones puntuales. Diferencias significativas respecto al grupo control sin inmunizar ($*p \leq 0,05$).

4.2.2. Caracterización de poblaciones celulares en leche.

4.2.2.1. Niveles de linfocitos totales y linfocitos T CD4+ y CD8+ en leche de cuartos desafiados.

El análisis de los linfocitos totales en los cuartos desafiados se presenta en la Figura 24. La cuantificación porcentual de esta población se realizó mediante el principio de delimitación de regiones (*gating*). En concreto, se utilizó el gráfico dot-plot de SSC-A frente a FSC-A para identificar y seleccionar la población de interés en función de sus características morfológicas (tamaño y complejidad celular relativos).

El desafío intramamario resultó inicialmente en una dinámica similar para todos los grupos experimentales. Se observó una disminución de los linfocitos totales hacia el día 2 pi, seguida de un incremento al día 4, punto en el cual los valores se restablecieron cerca de los niveles basales para el control sin inmunizar, mientras que se mantuvieron levemente inferiores para los grupos inmunizados. A partir del día 6 pi, la dinámica de esta población celular se comportó de manera diferente entre grupos. El grupo control mantuvo niveles estables durante el resto del período de seguimiento. En contraste, el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec mostró un ascenso gradual, alcanzando valores similares a los basales al día 14 pi, para luego descender a niveles cercanos a los mínimos al día 22 pi. Por su parte, el grupo Lip+Man+Rec registró una caída más pronunciada en el día 6 pi, seguido de una tendencia ascendente en los días 14 y 22 pi. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en todo el periodo evaluado, ya sea en cuanto al análisis global, como en las comparaciones día por día.

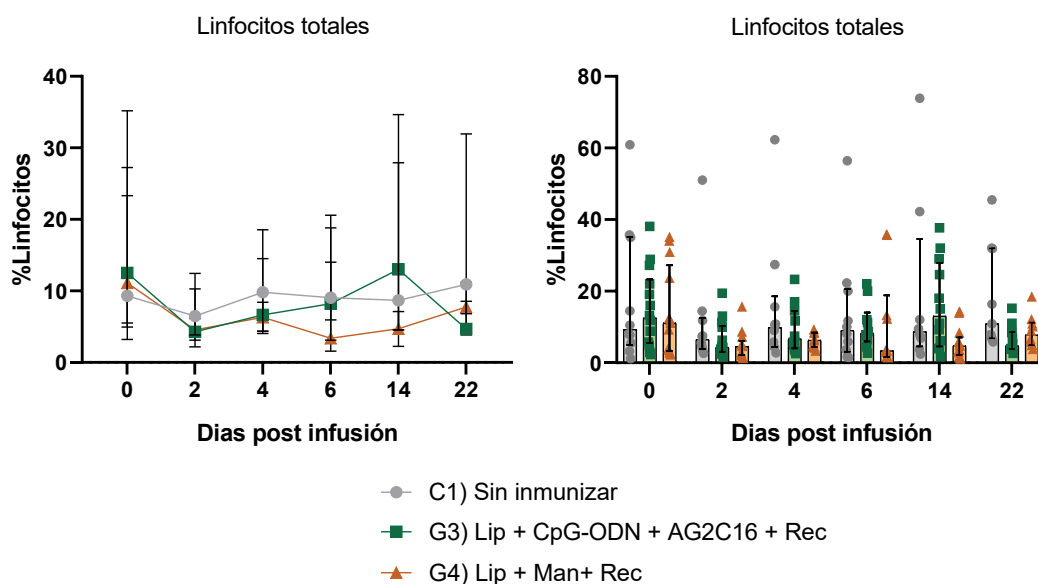


Figura 24. Dinámica de linfocitos totales en leche tras el desafío intramamario con *Staphylococcus aureus* 26L. La población se identificó mediante delimitación de regiones (*gating*) basada en parámetros de dispersión celular. El panel izquierdo representa la evolución temporal de las medianas (\pm RI) para cada grupo, mientras que el panel derecho muestra la distribución individual de los valores experimentales para cada punto de muestreo.

El estudio de las subpoblaciones de linfocitos T reveló diferencias en la dinámica de células T CD4⁺ (Figura 25) y T CD8⁺ (Figura 26) entre los grupos experimentales. Respecto de la población de LT CD4⁺, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a lo largo del estudio ($p > 0,95$), observándose una tendencia bastante similar, con ligeras fluctuaciones. El grupo sin inmunizar presentó un aumento en el día 2 pi alcanzado un valor de 15% (partiendo del basal de 8%), seguido de una disminución progresiva hasta un mínimo de 10,4% el día 4 pi, seguido de un ascenso hasta el 13.7% al día 22 pi. El grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec (G3) exhibió el aumento más marcado en el día 2 pi, alcanzando el 17% (desde un basal de 4%); este pico fue seguido por una caída transitoria hasta el 15% el día 4 pi, y un segundo incremento en el día 6 pi (21%), para finalmente descender y estabilizarse hacia el final del período de observación en torno al 14%. Por su parte, el grupo Lip+Man+Rec (G4) mantuvo niveles más estables de células CD4⁺ durante los primeros días pi alrededor del 10 % (similar a los basales). El día 6 pi se evidenció un aumento hasta 18 %, seguido de una caída transitoria hacia niveles basales el día 14 pi, y un segundo incremento que alcanzó aproximadamente el 15% en el día 22 pi.

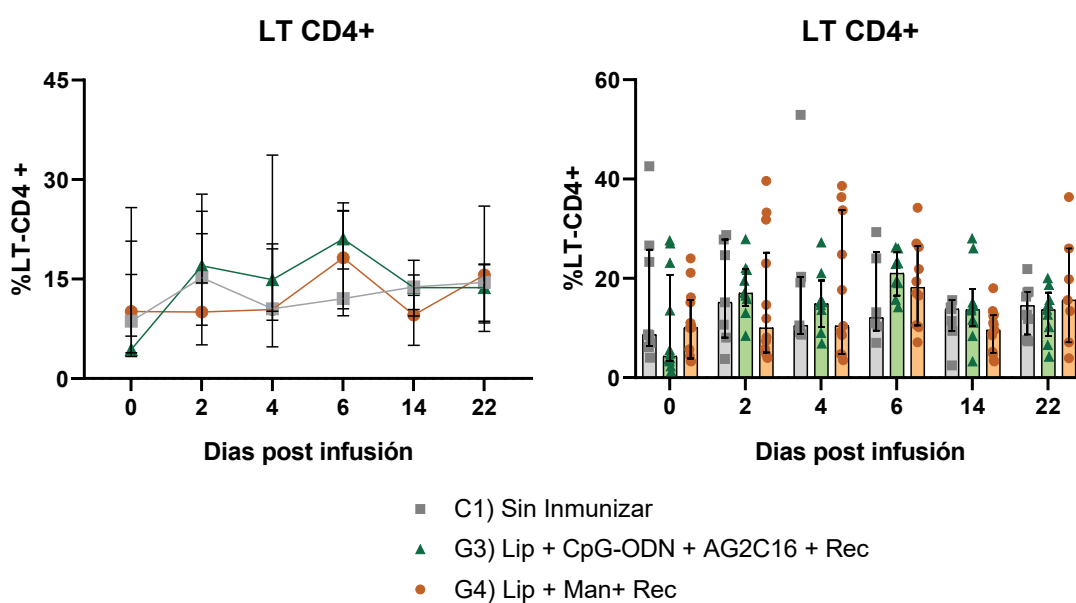


Figura 25. Dinámica de linfocitos T CD4⁺ en leche tras el desafío intramamario con *Staphylococcus aureus* 26L. Los gráficos muestran los cambios en la proporción de linfocitos T CD4⁺ en leche de cuartos desafiados a lo largo del tiempo en vacas inmunizadas con diferentes formulaciones y en el grupo control sin inmunizar. El panel izquierdo representa la evolución temporal de las medianas (\pm RI) para cada grupo. El panel derecho muestra la distribución individual de los valores experimentales para cada punto de muestreo.

En cuanto a la subpoblación de células T CD8⁺ (Figura 26), todos los grupos experimentaron una reducción relativa de aproximadamente el 10% al día 2 pi en comparación con sus niveles basales, seguida de una recuperación el día 4 pi hasta alcanzar nuevamente niveles basales. A partir de este punto, el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec mantuvo una tendencia estable en niveles basales

(aproximadamente 45%) hasta el día 22 pi, mientras que en el grupo sin inmunizar se observó una disminución transitoria en el día 6 pi (del 38 % al 29 %), seguida de un nuevo aumento hacia el final del período experimental con valores cercanos al 44%. En contraste, el grupo Lip+Man+Rec presentó porcentajes consistentemente menores de células CD8⁺ a lo largo de todo el ensayo en comparación con los otros grupos, registrando valores basales de 30% y mínimos cercanos a 20%. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas en el análisis global, tanto frente al grupo sin inmunizar como frente al grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec ($p < 0,05$). El análisis punto por punto, utilizando la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la corrección de Dunn, arrojó diferencias significativas únicamente en el día 6 pi entre el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec ($p < 0,01$).

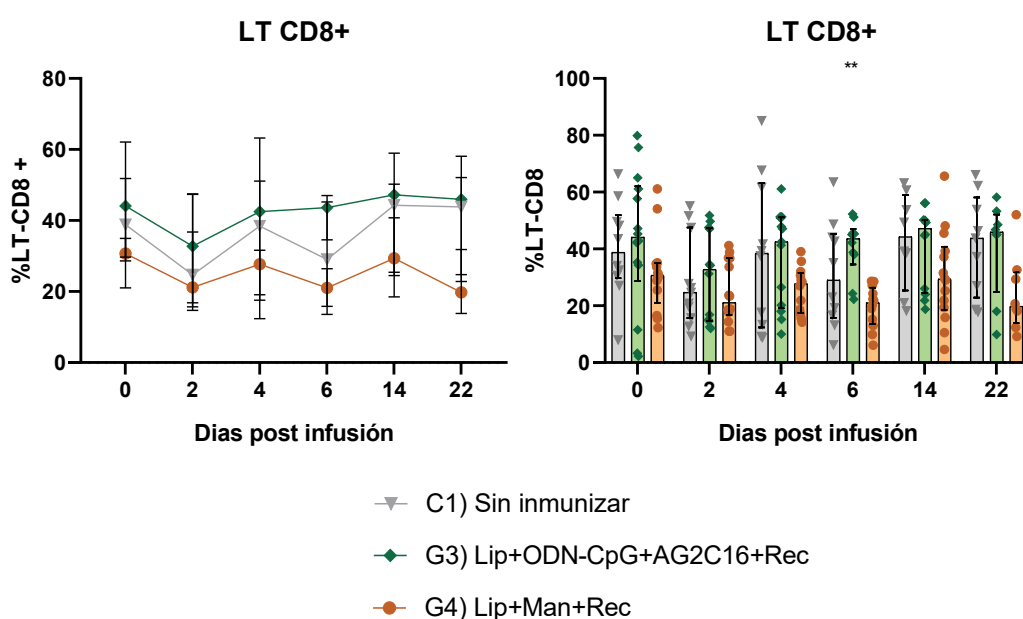


Figura 26. Dinámica de linfocitos T CD8⁺ en leche tras el desafío intramamario con *Staphylococcus aureus* 26L. Los gráficos muestran los cambios en la proporción de linfocitos T CD8⁺ en leche de cuartos desafiados a lo largo del tiempo en vacas inmunizadas con diferentes formulaciones y en el grupo control sin inmunizar. El panel izquierdo representa la evolución temporal de las medianas (\pm RI) para cada grupo. El panel derecho muestra la distribución individual de los valores experimentales para cada punto de muestreo. Diferencias significativas corresponden a la comparación entre los grupos G3 y G4 (** $p \leq 0,01$; prueba de Kruskal–Wallis seguida de la corrección de Dunn).

4.2.2.2. Niveles de Granulocitos totales (CH138A+) en leche de cuartos desafiados.

En cuanto a la población de granulocitos CH138A⁺ (Figura 27), la dinámica celular mostró variaciones entre los grupos experimentales a lo largo del estudio. Estas diferencias alcanzaron significancia estadística en el análisis global para el grupo Lip+Man+Rec frente al control sin inmunizar ($p < 0,05$). Inicialmente, todas las unidades experimentales presentaron porcentajes de CH138A⁺ acordes a una GM sana, oscilando entre el 10% y el 20%. Post-infusión, los grupos control

sin inmunizar y Lip+Man+Rec mostraron un patrón similar en los primeros días, alcanzando valores cercanos al 73% y 65% respectivamente en el día 4 pi. A partir de este punto, las tendencias divergieron: el grupo control mostró una disminución progresiva hasta el día 14 y un leve aumento hacia el final del periodo de seguimiento con valores cercanos al 45% mientras que el grupo Lip+Man+Rec continuó aumentando la población de neutrófilos hasta alcanzar su máximo en el día 6 pi (83%), seguido de una disminución al 68% en el día 14 pi y un nuevo ascenso hacia el final del ensayo, llegando al 80%. El grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec, por su parte, presentó un incremento temprano más pronunciado al comienzo del estudio, alcanzando valores máximos en el día 2 pi cercanos al 85%. Posteriormente, se evidenció una disminución marcada hacia el día 6 pi (50%), seguida de un ascenso en el día 14 pi, donde alcanzó niveles cercanos a los máximos iniciales (77%), y una nueva reducción hacia el final del ensayo (70%). En el análisis punto por punto, solo se observaron diferencias significativas al día 14 en el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec frente al control sin inmunizar ($p < 0,05$).

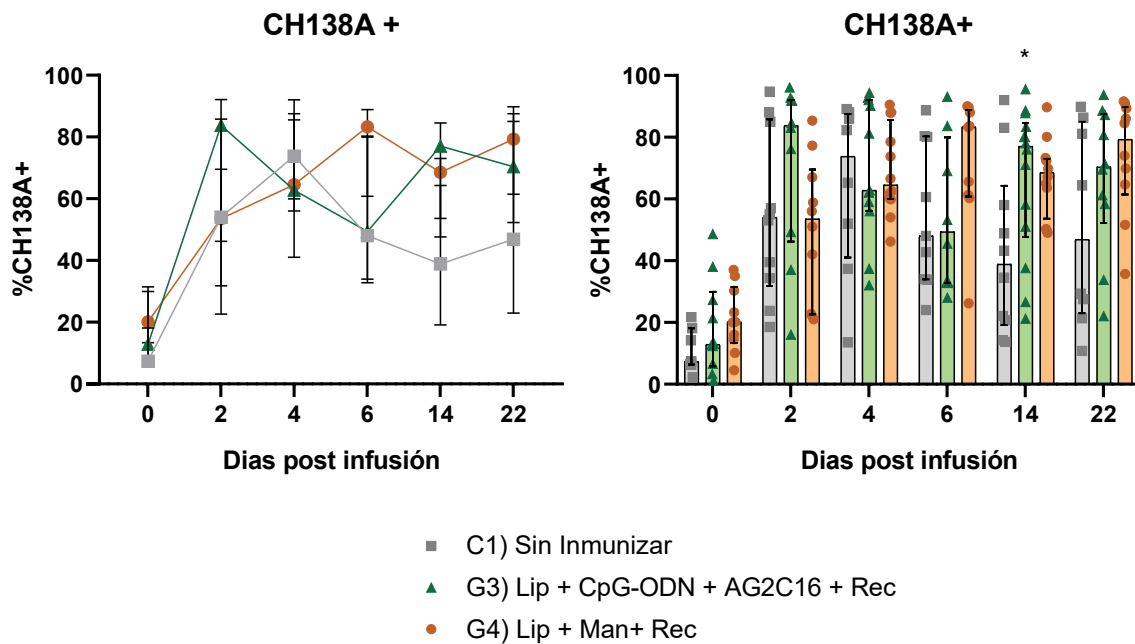


Figura 27. Dinámica de granulocitos CH138A+ en leche tras el desafío intramamario con *Staphylococcus aureus* 26L. Los gráficos muestran los cambios en la proporción neutrófilos en leche de cuartos desafiados a lo largo del tiempo en vacas inmunizadas con diferentes formulaciones y en el grupo control sin inmunizar. El panel izquierdo representa la evolución temporal de las medianas (\pm RI) para cada grupo. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la prueba de Dunn. Diferencias significativas respecto al grupo control sin inmunizar: $*p \leq 0,05$.

DISCUSIÓN

El presente capítulo se centra en la evaluación de la capacidad protectora y la respuesta inmunológica local inducida por dos formulaciones vacunales en vaquillonas de primer parto, tras un desafío experimental intramamario con *Staphylococcus aureus*. Los inmunógenos seleccionados (Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec), cuya caracterización se detalla en el Capítulo 1 de esta tesis, fueron diseñados con adyuvantes liposomales combinados con inmunoestimulantes.

Respuesta humoral sistémica al refuerzo preparto

Como se describió en el capítulo anterior, los animales utilizados en este estudio recibieron previamente 3 dosis de los inmunógenos mencionados. Un mes antes de la fecha estimada de parto, todos los animales seleccionados recibieron una cuarta dosis de refuerzo. Como práctica rutinaria, la vacunación preparto tiene por función estimular la respuesta inmune contra antígenos de interés para que la madre los transfiera a las crías a través del calostro (Kherli & Harp, 2001). En el caso de las vacunas contra patógenos causantes de mastitis, el objetivo es reforzar las defensas inmunes de la GM dado que durante el período periparto las vacas atraviesan un estado de inmunosupresión progresiva. En particular, hacia las tres semanas previas al parto se observa una disminución sostenida de las poblaciones linfocitarias y de la capacidad de respuesta inmunitaria, lo que convierte el momento de la inmunización en un factor determinante para la eficacia vacunal, para asegurar una adecuada activación del sistema inmune antes del inicio de la inmunosupresión (Menichetti et al., 2021). En este estudio, el análisis de la respuesta humoral específica mostró que la dosis de refuerzo aplicada al preparto tras un intervalo de aproximadamente 6 meses desde la última vacunación estimuló la producción de anticuerpos séricos hasta niveles similares a los observados luego de la segunda dosis del esquema inicial, lo que refuerza la evidencia de que estas formulaciones son capaces de inducir memoria inmunológica. Este refuerzo, fue capaz de estimular niveles significativamente elevados de IgG sérica con respuestas más sostenidas frente a rAt, rBt y rClfA, y menos evidentes para rFnbpA, manteniéndose elevados durante al menos 30 días post-vacunación. Estos resultados coinciden con estudios previos que reportaron un aumento sostenido en los anticuerpos en suero después de refuerzos preparto, tanto utilizando toxoides formulados con adyuvantes clásicos (Boerhout et al., 2018), como con antígenos recombinantes formulados con adyuvantes liposomales (Reidel et al., 2019). Asimismo, el refuerzo con ambas formulaciones experimentales (Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec y Lip+Man+Rec) logró estimular la producción de subclases de IgG1 e IgG2 en suero. Estos hallazgos concuerdan con resultados previos de nuestro grupo (Reidel et al., 2019), donde vaquillonas inmunizadas con moléculas recombinantes de FnbpA y ClfA fusionadas a TRX y formuladas con un adyuvante liposomal presentaron niveles séricos

significativamente elevados tanto de IgG1 como de IgG2 específicas 15 días después del refuerzo preparto.

En el presente trabajo, y a diferencia de lo observado con los demás componentes antigénicos de la vacuna, la respuesta humoral contra la rFnbpA fue notablemente reducida. Esta baja inmunogenicidad contrasta con resultados previos de nuestro grupo (Reidel et al., 2019), donde la inmunización de vaquillonas con FnbpA y ClfA, fusionadas a TRX y formuladas con liposomas y CpG-ODN indujo niveles elevados de IgG específica contra ambos antígenos desde el día 30 hasta el día 75 post-immunización, sin diferencias significativas en la respuesta entre ambas proteínas, demostrando una respuesta balanceada frente a ambos antígenos. Esta discrepancia podría explicarse por diferencias en el esquema de inmunización, así como en la concentración de antígeno inoculado. Sin embargo, un factor a considerar particularmente son las características estructurales de los antígenos recombinantes empleados. En este estudio, como se detalló en el Capítulo 1, todos los antígenos fueron expresados sin fusión a TRX. La ausencia de esta proteína de fusión, conocida por favorecer el plegamiento correcto y la solubilidad de antígenos heterólogos, podría haber derivado en una conformación inestable o en la formación de agregados con menor exposición de epítopes críticos, comprometiendo así su inmunogenicidad. Esta hipótesis cobra particular relevancia considerando que rFnbpA fue el único de los cuatro antígenos que mostró una respuesta significativamente reducida, mientras que rAt, rBt y rClfA indujeron respuestas robustas y comparables a las observadas en estudios previos, sugiriendo que rFnbpA podría ser estructuralmente más susceptible a problemas de plegamiento y estabilidad en ausencia de TRX. La región expresada de rFnbpA corresponde a los dominios de unión a fibronectina, los cuales se definen estructuralmente como regiones intrínsecamente desordenadas o carentes de una estructura secundaria estable en su estado libre (Loughman et al., 2008; Stemberk et al., 2014). Esta carencia de estructura secundaria significa que, en ausencia de su ligando (la fibronectina), los péptidos se mantienen en un estado extendido y flexible siendo su estabilidad extremadamente baja debido a su desorden intrínseco (Bingham et al., 2008; Foster et al., 2014). En este sentido la ausencia de TRX puede aumentar la tendencia de estos péptidos desordenados a formar agregados inespecíficos o a degradarse prematuramente, limitando la disponibilidad de epítopes conformacionales para el sistema inmune (Loughman et al., 2008). Con el objetivo de abordar estas limitaciones, se realizó una colaboración con el Instituto Pasteur de Montevideo, en el marco de una pasantía UNU-BIOLAC, en la cual se planteó la expresión de dos variantes antigénicas alternativas de rFnbpA. Los resultados de esta optimización estructural se encuentran detallados en el Anexo III.

Desafío experimental, ensayo piloto.

Luego del ensayo piloto de infección experimental, la selección de la cepa *S. aureus* 26L para el ensayo de desafío se basó en los RCS, recuentos bacterianos y escala clínica observados, que resultaron compatibles con una IIM subclínica y persistente en vaquillonas. Esto permitiría simular de manera más realista las condiciones naturales de infección, ya que ésta es la forma de presentación más frecuente de IIMs por *S. aureus* (Zecconi et al., 2006). Estos hallazgos experimentales resultaron consistentes con el comportamiento de estas cepas observado en condiciones naturales (Camussone et al., 2022), donde la cepa 26L (CC97, *agrI*, *cap5*) fue originalmente aislada de una IIM subclínica persistente en vaquillonas de primera lactancia, mientras que la cepa 9L (CC1, *agrIII*, *cap8*) correspondió a una IIM transitoria con alto RCS. Este comportamiento diferencial también coincide con estudios previos (Engler et al., 2022), donde cepas aisladas de casos naturales con características de persistencia (aislamiento durante 6 meses consecutivos, CC188, *agrI*, *cap8*) o transitoriedad (aislamiento único, ST350, *agrII*, *cap5*), al ser evaluadas en condiciones de infección experimental establecieron, respectivamente, IIM persistentes con respuesta inflamatoria retardada o una respuesta temprana e intensa con rápida eliminación bacteriana. Esta concordancia entre el comportamiento natural y los hallazgos del ensayo piloto refuerza la validez de la cepa 26L como modelo apropiado para evaluar estrategias de protección frente a infecciones subclínicas persistentes, que representan el mayor desafío en el control de la mastitis estafilocócica.

Un punto clave a tener en cuenta luego a la hora de discutir los resultados de este trabajo será el comportamiento del linaje CC97 al cual pertenece la cepa 26L. Aunque este clon se originó inicialmente en humanos, logró adaptarse al ganado bovino y se convirtió en uno de los complejos clonales más vinculados a la mastitis subclínica (Smith et al., 2005; Niedziela et al., 2020). Sin embargo, su importancia excede la especie bovina, ya que tiene el potencial de producir un salto interespecífico y volver a infectar a las personas (Yebra et al., 2022). Esto deja clara la necesidad de controlar este patógeno bajo el enfoque de Una Salud. Existe evidencia creciente que indica que diferentes *clusters* genéticos de *S. aureus* presentan adaptaciones específicas al hospedador o al ambiente. En este sentido, la cepa 26L, caracterizada como *cap5-agrI*, pertenece al grupo de cepas que parecen estar mejor adaptadas para establecer infecciones crónicas en la glándula mamaria, caracterizadas por la ausencia de signos clínicos evidentes de inflamación (Buzzola et al., 2007; Melchior et al., 2009; Bardiau et al., 2016; Rossi et al., 2021).

Desafío experimental: generalidades y eficacia.

En este estudio se propuso como modelo para evaluar la capacidad protectora conferida por los inmunógenos ensayados una infección intramamaria experimental con la cepa seleccionada previamente.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo (Camussone et al., 2022) se evaluó la eficacia de una formulación compuesta por un inmunógeno similar a los evaluados en este estudio: rFnbpA, rClfA, rAt y rBt, todos fusionados a TRX e incorporados en liposomas catiónicos y CpG-ODN. En dicho estudio, realizado bajo condiciones de desafío natural, se observó en el grupo vacunado una reducción en la proporción de animales que desarrollaron nuevas IIM y un aumento en el tiempo hasta la aparición de la infección. Aunque la incidencia general de enfermedad fue baja y no permitió obtener una confirmación estadística, los resultados sugirieron un posible efecto protector asociado a la formulación. Otros autores también han reportado efectos protectores bajo condiciones de desafío natural (Vidlund et al., 2024). En ese estudio, la vacunación con proteínas de superficie de *S. aureus* o de *Staphylococcus* no aureus, formuladas con el adyuvante Emulsigen-D, redujo la incidencia de mastitis y generó aumentos significativos en los títulos de anticuerpos específicos en leche durante la lactancia. Estos resultados, aunque muestran una protección parcial, coinciden en que las fórmulas basadas en inmunógenos de superficie pueden modular la respuesta inmune y disminuir la incidencia de nuevas IIM. Las pruebas de evaluación con exposición natural son de gran valor, ya que reflejan la variabilidad que ocurre en condiciones de campo (Knight Jones et al., 2014). Sin embargo, es necesario considerar las limitaciones de estas pruebas, las cuales requieren un número muy elevado de animales y una alta incidencia de infección en el rodeo para obtener resultados claros. Por el contrario, el desafío experimental, como el utilizado en este trabajo, ofrece las ventajas de trabajar con un menor número de animales y bajo condiciones mucho más controladas, lo que facilitaría la evaluación directa de aspectos relevantes de la respuesta inmune asociados con la eficacia de la vacuna (Knight Jones et al., 2014; Rainard et al., 2021).

En este estudio, el comportamiento conjunto de la carga bacteriana y el RCS luego del desafío intramamario sugiere una respuesta inflamatoria activa pero poco resolutive frente a la infección. Los grupos vacunados mostraron niveles de *S. aureus* en leche levemente superiores al control durante los primeros días postinfección, lo que indica en parte que la inmunización no mejoró la capacidad de control bacteriano inicial. El efecto protector de la vacunación debería manifestarse una vez que el patógeno induce tanto la respuesta innata como la respuesta adaptativa, con presencia de neutrófilos que fagociten activamente bacterias opsonizadas por IgG2. Según el modelo propuesto por Burton & Erskine (2003), se esperaría que entre 24 y 48 h post-infección la carga bacteriana comenzara a disminuir en los grupos vacunados como resultado de esta fagocitosis direccionada y activa. Sin embargo, en el presente estudio no se observó este patrón protector. En particular, los

picos tempranos y altos de UFC en los grupos vacunados, seguidos de una disminución gradual, podrían reflejar una activación inmunitaria temprana, representada por un aumento del RCS, pero en parte ineficaz para contener la multiplicación bacteriana. El aumento del RCS en todos los grupos, refuerza la idea de una respuesta inflamatoria inducida más por la presencia del patógeno que por un efecto inmunomodulador protector de la vacunación. El hecho de que los niveles de RCS en los grupos inmunizados fueran similares al control, sin traducirse en una eliminación bacteriana más eficiente sugiere una desconexión entre el reclutamiento celular y la capacidad fagocítica efectora.

Si bien existen pocos estudios que evalúan de manera directa la capacidad protectora de las vacunas a través de un desafío experimental por *S. aureus*, algunos autores han reportado efectos parciales sobre estos parámetros. Cabe destacar que en los ensayos que se comparan a continuación se utilizaron distintas concentraciones bacterianas para el desafío, así como distintos tiempos de inoculación respecto del parto, lo cual debe ser tenido en consideración para establecer comparaciones. En el presente estudio, la elección de una dosis de desafío de 100-150 UFC permitió evaluar el efecto protector de las vacunas, sin generar un estímulo excesivo al sistema inmune que pudiera enmascarar diferencias entre grupos o resultar en respuestas inflamatorias agudas no representativas de lo que ocurre en el campo. Alabdullah et al., (2021) informaron una disminución significativa en el RCS en vacas de tercera y cuarta lactancia vacunadas por vía intranasal con dos dosis de una formulación compuesta por los antígenos IsdA y ClfA acoplados a la plataforma CTA2/B de la toxina del cólera como adyuvante. Los autores observaron que, aunque se logró mitigar los signos clínicos de la mastitis y reducir la inflamación en comparación con el grupo control, no se evidenciaron diferencias significativas en las cargas bacterianas tras el desafío intramamario con 400 UFC de *S. aureus* Newbould 305 en la mitad de la lactancia. Si bien la cepa *S. aureus* Newbould 305 se ha utilizado ampliamente en experimentación en mastitis bovina, pertenece al ST115, que se asocia principalmente con la piel del pezón (Smith et al., 2005) y no representaría a los aislamientos más frecuentes de *S. aureus*. Sin embargo, puede persistir en glándulas mamarias infectadas, ya que se ha recuperado de leche al menos 36 días después una inoculación experimental (Atalla et al., 2009). Middleton et al., (2006) evaluaron la eficacia de LysiginTM mediante un desafío experimental intensivo con 250 UFC de *S. aureus* Newbould durante tres días consecutivos para asegurar el establecimiento de la infección. Si bien se observó una reducción de la gravedad y la duración de la enfermedad clínica tras la exposición, no observaron diferencias significativas en la incidencia de IIM. Por su parte, Prenafreta et al., (2010) evaluaron la eficacia de una bacterina de *S. aureus* con alto contenido de SAAC (complejo antigénico asociado al slime) suplementada con *E. Coli* J5 en adyuvante oleoso, luego de la inmunización sistémica en vacas gestantes primíparas. Los animales fueron sometidos a un desafío intramamario alrededor del día 23 de lactancia con una cepa virulenta de *S. aureus* (CC195, *cap8*), a una dosis de 8×10^3 UFC. En estas condiciones, los autores observaron una reducción significativa del recuento bacteriano en leche en comparación con el grupo control.

Sin embargo, el RCS no mostró diferencias significativas entre los grupos durante el período posterior al desafío lo cual coincide con el concepto de que el RCS refleja principalmente el reclutamiento celular en respuesta a la infección, pero no necesariamente la eficacia de la eliminación bacteriana. En resumen, ninguna de las vacunas ensayadas en estos estudios logró prevenir completamente la aparición de nuevas IIM, lo que pone de manifiesto no solo la complejidad de inducir una inmunidad protectora eficaz frente a *S. aureus*, sino también la dificultad de establecer un modelo de infección experimental que permita evaluar adecuadamente la protección inducida por una vacuna.

Debe tenerse en cuenta que, así como se plantearon limitantes para los modelos de exposición natural para evaluar la eficacia de una vacuna para mastitis bovina, los estudios de desafío experimental también las tienen. Las diferencias observadas entre las investigaciones mencionadas podrían atribuirse a distintos factores principales como el tipo y formulación de las vacunas utilizadas, el segmento de animales utilizados, la naturaleza de las cepas utilizadas para el desafío o a las concentraciones de inóculo, lo cual genera distintos grados de respuesta tanto innata como adquirida. Las características genéticas y fenotípicas de cada aislado de *S. aureus* influyen notablemente en la virulencia, la capacidad de persistencia y la respuesta inmunitaria del hospedador (Engler et al., 2022, Calvino & Dallard, 2023a), dificultando así la comparación directa entre resultados. A su vez, Murphy et al., (2019) sugieren que cada linaje de *S. aureus* posee un conjunto único de características inmunogénicas que determinan la intensidad de la respuesta inflamatoria y el desenlace de la IIM. Por otra parte, el tipo de animales incluidos en los estudios puede influir en los resultados, ya que animales con más lactancias previas pueden haber estado expuestos durante más tiempo al microorganismo y presentar cierta memoria inmune. Asimismo, la exposición previa al patógeno no necesariamente actúa como un modelo de protección efectiva, sino que podría ser indicativo de una falla en los mecanismos de memoria inmunológica local o de la persistencia de infecciones subclínicas (Rainard et al., 2022c). En este sentido, se ha observado que tanto los cuartos mamarios recuperados de una infección natural por *S. aureus* como aquellos expuestos al patógeno dentro de la misma ubre presentan una mayor tasa de nuevas IIM (Zadoks et al., 2001), lo que sugiere que la exposición previa podría predisponer al tejido a una mayor susceptibilidad en lugar de conferir una inmunidad protectora. La dificultad para encontrar un modelo de IIM representativo radica en que la infección natural de la glándula mamaria no induce una memoria inmunológica protectora. Esto sugiere que los modelos basados en la inmunidad natural son insuficientes, ya que el huésped y el patógeno han co-evolucionado hacia un estado de persistencia subclínica, donde la bacteria utiliza estrategias de evasión y el sistema inmune tiende a la tolerancia o aceptación para preservar la secreción láctea en lugar de buscar la eliminación bacteriológica (Rainard et al., 2022c). Por otro lado, los desafíos experimentales a menudo fallan al no replicar esta cronicidad ni reflejar la

diversidad antigénica de las cepas de campo, lo que limita la validez del modelo para predecir la eficacia de una vacuna en condiciones reales (Rainard et al., 2022c).

Respuesta humoral en GM post vacunación

Respecto de la respuesta humoral inducida por la vacunación en la GM, la detección de IgG específica contra los antígenos vacunales en leche al momento del desafío (aproximadamente 60 días post-refuerzo y 30 días post-parto) demuestra que el esquema de inmunización aplicado indujo una respuesta humoral local persistente en la GM. Esta presencia de inmunoglobulinas durante el periodo posparto es particularmente relevante, ya que confirma que la estrategia de inmunización logra mantener una respuesta humoral específica en la glándula mamaria tras superar el estrés fisiológico del periparto (Burton & Erskine, 2003). A su vez, se analizaron las subclases IgG1 e IgG2 presentes en leche al momento del desafío. En este punto temporal, la presencia de IgG1 específicas fue evidente en los grupos inmunizados, destacándose el grupo Lip+Man+Rec con niveles significativamente superiores para todos los antígenos evaluados (rAt, rBt, rClfA y rFnbpA), mientras que el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec mostró incrementos significativos frente a rAt y rFnbpA. Por el contrario, la respuesta de IgG2 en leche fue más limitada, ya que solo se observó una respuesta significativamente superior frente al antígeno rAt en los animales inmunizados con Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec. Estos resultados indican que la inmunización pre-parto con ambas formulaciones generó una respuesta humoral local en GM predominantemente mediada por IgG1, con una participación limitada y antígeno-específica de IgG2.

En estudios previos de nuestro grupo se evaluó la respuesta humoral en leche tras la vacunación preparto con una formulación compuesta por FnbpA y ClfA fusionadas a TRX y formulada con un adyuvante liposomal. Quince días post-vacunación se observó una tendencia hacia mayores niveles de IgG e IgG1 específica, sin incrementos detectables de IgG2 (Reidel et al., 2019). De manera similar, Pujato et al., (2018) reportaron que vaquillonas inmunizadas con dos dosis al preparto de Bt, ClfA y FnbpA fusionadas a TRX y formuladas con ISCOM-Matrix, presentaron niveles elevados de IgG total en leche durante el primer mes posparto (días +7 a +30), con concentraciones relativamente altas de IgG1 específica, pero niveles significativamente más bajos de IgG2. Benedictus et al., (2019), trabajando con las proteínas recombinantes de evasión inmune LukM y Efb de *S. aureus* formuladas con CTA2/B, encontraron niveles significativamente más altos de IgG1 y IgG2 específicas tanto en calostro como en suero dos semanas posparto tras el refuerzo previo al parto. Sin embargo, en leche (dos semanas posparto) solo los anticuerpos IgG1 específicos se mantuvieron significativamente elevados. A pesar de las diferencias metodológicas entre estudios (tipo de antígenos, adyuvante, esquema de inmunización) todos ellos convergen en que la inmunización sistémica preparto con antígenos de *S. aureus* induce una respuesta humoral local en la glándula mamaria predominantemente mediada por IgG1, con una participación limitada o ausente de IgG2.

Respuesta humoral en GM post desafío

Tras la infusión del patógeno, los niveles de IgG específicas en leche frente a rAt, rBt y rClfA se mantuvieron elevados y significativamente superiores a los del grupo control durante todo el período de seguimiento, particularmente en el grupo Lip+Man+Rec y, en menor medida, en el grupo Lip+CpG-ODN+AG2-C16+Rec. No obstante, el desafío intramamario con 100 UFC de *S. aureus* 26L no indujo una estimulación de los niveles de anticuerpos específicos adicional a la existente. Un comportamiento comparable fue descrito por Shkreta et al., (2004) en vaquillonas Holstein preñadas de siete meses, en las que se evaluó una estrategia de inmunización basada en una vacuna de ADN seguida de un refuerzo con proteínas recombinantes (D1D3 y ClfA), y posteriormente sometidas a un desafío intramamario realizado tres semanas posteriores al parto, con 900 UFC/cuarto de la cepa Newbould 305. En dicho estudio, el refuerzo previo al desafío indujo un incremento de todos los isotipos de IgG, que se mantuvieron elevados y estables durante los 21 días posteriores al desafío, sin evidenciarse una respuesta humoral adicional atribuible a la infección. En contraste, Alabdullah et al., (2021) describieron un patrón diferente en vacas Holstein en lactancia media (tercera o cuarta lactancia) inmunizadas por vía intranasal con la formulación IsdA+ClfA-CTA2/B desafiadas con 400 UFC de la cepa *S. aureus* Newbould 305, donde el desafío experimental indujo un aumento marcado de IgG total a los 10 días post-desafío. En el presente estudio, la ausencia de un incremento significativo de IgG específica, incluso en los animales no vacunados, sugiere que la infección con la cepa *S. aureus* 26L no generó un estímulo inflamatorio o antigénico suficiente para promover una reestimulación de la respuesta humoral detectable en leche. Esto podría sugerir una baja capacidad inmunogénica de la cepa *S. aureus* 26L la cual resultó insuficiente para inducir una amplificación detectable de la respuesta humoral local en la GM. Este fenómeno se reflejó además claramente al analizar la respuesta frente al lisado bacteriano completo, donde se observó que los niveles de IgG total permanecieron cercanos a los valores basales en todos los grupos, lo que indica una respuesta humoral limitada frente a la bacteria utilizada para la infección. Esta observación iría en línea con la propuesta de algunos autores sobre la eficacia de las interacciones tempranas de *S. aureus* con el hospedador, que incluyen la invasión inmediata de las células epiteliales mamarias y la falla en la activación de la cascada de señalización NF- κ B, las cuales están orientadas a lograr una evasión activa de la respuesta inmune desde el momento inicial de la infección (Günther et al., 2017).

A su vez, se evaluaron las subclases IgG1 e IgG2 presentes en la GM como respuesta al desafío. En la glándula mamaria sana, el perfil de inmunoglobulinas está dominado por la IgG1, la cual es transportada de forma selectiva hacia las secreciones mamarias desde la sangre. Por el contrario, la IgG2 se encuentra en concentraciones muy bajas en condiciones de salud basal, ya que su ingreso a la glándula ocurre principalmente de forma coordinada con la diapédesis de los neutrófilos en respuesta a un estímulo inflamatorio (Sordillo & Streicher, 2002). De todas formas, cabe aclarar que

estos conceptos son modelos propuestos por distintos autores, y existe poca evidencia experimental de que realmente sea lo que ocurre en el contexto de una IIM, o si esto se ve influenciado, por ejemplo, por las características de la cepa infectante. En este estudio se observó una respuesta local mediada principalmente por IgG1 luego de la infección experimental, con producción de IgG2 específica solo frente al antígeno rAt, mientras que no fue detectable frente a rClfA y rFnbpA, antígenos clave que intervienen en las interacciones tempranas durante el establecimiento de la infección. Sin embargo, los niveles detectados luego del desafío no superaron a los encontrados antes del mismo. Según el modelo propuesto por Burton & Erskine (2003), el reclutamiento masivo de neutrófilos durante las primeras 24-48 h posinfección debería ir acompañado de un aumento en la permeabilidad vascular que permita el ingreso de IgG2 opsonizante desde la circulación hacia la glándula mamaria, facilitando así la fagocitosis dirigida de las bacterias opsonizadas. Sin embargo, en el presente estudio este mecanismo no pareció cumplirse de manera efectiva. A pesar del incremento observado en el RCS tras el desafío, no se observó un incremento en los niveles de IgG2, lo cual podría haber limitado severamente la actividad fagocítica de los neutrófilos permitiendo la progresión y persistencia del patógeno. Varios factores podrían explicar esta desconexión entre reclutamiento celular y llegada de anticuerpos opsonizantes. La llegada de anticuerpos opsonizantes al sitio de infección depende estrechamente de la exudación de plasma, un proceso que solo se activa ante una inflamación masiva (Rainard et al., 2003; Rainard et al., 2022c). En principio, se puede postular que la baja concentración bacteriana utilizada en el desafío (100-150 UFC), o las características de persistencia de la cepa 26L podrían haber generado una respuesta inflamatoria insuficiente para movilizar una cantidad crítica de IgG2 desde la sangre. En este sentido, Prenafreta et al., (2010), vacunaron vaquillonas con bacterinas de *S. aureus* con alto contenido de SAAC al parto, y las desafiaron 23 días por parto con una concentración de 8×10^3 UFC de una cepa virulenta de *S. aureus*. Los autores observaron incrementos significativos de IgG e IgG1 específicas en leche, pero un aumento limitado de IgG2 en leche tras el desafío. La vacunación tampoco previno la IIM por *S. aureus*, aunque reportaron una reducción significativa del recuento bacteriano en leche en el grupo vacunado en comparación con el control. Además, observaron una correlación negativa entre los títulos de anticuerpos en el día del desafío y el recuento de *S. aureus* en leche al día siguiente, sugiriendo que la respuesta de anticuerpos específicos podría estar involucrada en la protección contra la IIM. En el caso de Alabdullah et al., (2021), en vacas en lactancia media inmunizadas con la formulación IsdA+ClfA-CTA2/B, la respuesta al desafío con 400 UFC de la cepa *S. aureus* Newbould 305, fue predominantemente de IgG1, aunque sin diferencias significativas entre vacunados y controles. En un estudio previo, vacas en lactancia media (2 a 3 lactancias previas), no inmunizadas, fueron desafiadas con 250 UFC/cuarto con dos cepas de campo con características de persistencia (806) o no persistencia (5011) (Engler et al., 2022). A pesar de que se indujo una respuesta humoral en leche frente a ambas cepas, la cepa 806 indujo una respuesta más marcada de IgG e IgG1, mientras que la cepa 5011 fue más efectiva en inducir una respuesta de IgG2. Sin

embargo, la eliminación bacteriana de la cepa 806 ocurrió en la mayoría de los cuartos inoculados antes del día 14 post-infección, mientras que la cepa 5011 persistió en la mayoría de los cuartos desafiados. Frente a estos resultados los autores ponen en duda el valor protector de la IgG2, al menos en ese estudio.

En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque las formulaciones vacunales estimularon adecuadamente la producción y persistencia de anticuerpos a nivel sistémico, los niveles en GM fueron relativamente bajos. Asimismo, el sesgo hacia una respuesta local predominantemente de IgG1, en conjunto con una baja concentración de IgG2 contra antígenos superficiales clave de *S. aureus* podría haber comprometido la capacidad opsonofagocítica necesaria para promover una eliminación bacteriana inicial eficaz. A su vez, y sobre la base de las investigaciones de otros autores mencionadas, ésta limitada respuesta humoral no parecería estar relacionada de forma excluyente a las características de la cepa infectante ni a la concentración de inóculo utilizado.

Respuesta celular en GM

Se evaluaron diferentes marcadores de la respuesta inmune innata y adaptativa en leche tras el desafío con la cepa *S. aureus* 26L en los tres grupos experimentales, cuyos comportamientos se discuten a continuación. Sin embargo, cabe aclarar que, al momento de escritura de esta tesis, no se encontraron en bibliografía reportes de evaluaciones exhaustivas de respuesta celular en leche luego de una IIM experimental en bovinos, en el contexto de la evaluación de vacunas contra *S. aureus*. Por lo tanto, la discusión de los resultados del presente trabajo se plantea sobre la base de estudios de respuesta inmune luego de una IIM experimental en bovinos no inmunizados.

Producción de citoquinas

La IL-1 β y la IL-8 son citoquinas proinflamatorias clave en la respuesta temprana de la GM frente a infecciones bacterianas. La IL-1 β induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y quimiocinas, amplificando el reclutamiento leucocitario y la respuesta inmune innata, mientras que la IL-8 es fundamental para el reclutamiento específico de neutrófilos hacia el sitio de infección (Calvinho & Dallard, 2023b). En el presente estudio, la producción de ambas citoquinas fue mínima o indetectable en la mayoría de los cuartos desafiados. Específicamente, la IL-1 β se mantuvo en niveles bajos cercanos al límite de detección en la mayoría de los cuartos, con excepciones aisladas en cuartos donde la secreción fue detectable y coincidió con RCS elevados (datos no mostrados). Por su parte, el grupo Lip+Man+Rec mostró una inducción más temprana y significativa de IL-8 al día 2 posinfección en comparación con los demás grupos, condicionada por algunos animales que presentaron valores muy elevados, y esta respuesta coincidió con el valor máximo de RCS para ese grupo (5,78 log₁₀ cel/mL). En contraste, el grupo control presentó una estimulación mínima de IL-8 durante todo el periodo evaluado. Esta respuesta limitada de citoquinas

proinflamatorias es consistente con lo reportado en la literatura para cepas de *S. aureus* con alta capacidad de adaptación a la GM. Estudios previos demostraron que la detección de IL-1 β e IL-8 en leche es altamente variable y dependiente tanto de la severidad del cuadro clínico como del genotipo bacteriano (Riollet et al., 2000; Bannerman et al., 2004). Por ejemplo, tras infecciones intramamarias experimentales de vacas en mitad de lactancia con aproximadamente 40 UFC de la cepa *S. aureus* Newbould 305 (CC97, ST115), Bannerman et al., (2004) detectaron incrementos de IL-1 β únicamente entre las 32 y 40 horas post-infección, mientras que no detectaron IL-8 en leche ni en células somáticas. De manera similar, Riollet et al., (2000) no detectaron IL-1 β ni IL-8 tras desafiar vacas con aproximadamente 100 UFC de una cepa de campo de comportamiento persistente (107-59) durante un seguimiento de 1 a 28 días post-infección, lo cual se asoció con un aumento tardío y bajo del RCS y con el aislamiento del microorganismo hasta 28 días post-infección, indicando la evolución de la infección hacia la persistencia. Estudios más recientes han confirmado que la respuesta de estas citoquinas depende estrechamente del genotipo bacteriano y la capacidad de adaptación de la cepa. Engler et al., (2022) reportaron que cuartos inoculados con la cepa 806 (no persistente, ST350) indujeron un pico marcado de IL-1 β al día 2 post-infección, coincidiendo con el pico máximo de RCS, mientras que la cepa 5011 (persistente, CC188) mostró niveles similares al control con bajos RCS durante todo el estudio. En concordancia, Niedziela et al., (2020) observaron que la cepa MOK124 (CC151), asociada con mastitis clínica severa, provocó una secreción significativa de IL-1 β (pico a las 168 horas post-infección) y de IL-8 durante la primera semana de infección, correlacionándose con mayor RCS, mientras que la cepa MOK023 (CC97), de comportamiento subclínico, no indujo secreción detectable de IL-1 β en ningún punto del ensayo (24 a 168 horas post-infección) y mostró niveles significativamente menores de IL-8. Estos antecedentes refuerzan la hipótesis que la presencia de estas citoquinas en leche es un evento transitorio fuertemente condicionado por el linaje bacteriano y la severidad de la manifestación clínica. No obstante, la inducción temprana y significativa de IL-8 observada en el grupo Lip+Man+Rec, a pesar de las características intrínsecamente poco inmunogénicas de la cepa 26L, sugiere un efecto de la vacunación sobre los mecanismos de reconocimiento temprano del patógeno. Sin embargo, la persistencia bacteriana observada en la mayoría de los cuartos desafiados, independientemente del grupo experimental, indica que esta respuesta inflamatoria temprana, aunque potenciada en algunos animales vacunados, no fue suficiente para lograr la eliminación bacteriana efectiva.

Adicionalmente, no se detectaron concentraciones medibles de IL-17 ni de IFN- γ en leche en ninguno de los grupos experimentales, ni antes del desafío ni durante el período de seguimiento. Estas citoquinas juegan roles centrales en la respuesta inmune adaptativa celular. El IFN- γ potencia la activación de macrófagos, la presentación antigénica y funciona como nexo entre la inmunidad innata y adaptativa (Calvinho & Dallard, 2023b). Por su parte, si bien la IL-17 ha sido propuesta como un mediador central en la defensa epitelial al promover el reclutamiento de neutrófilos, su rol en la

mastitis bovina sigue siendo más teórico que comprobado, existiendo aún importantes lagunas sobre su cinética y fuentes celulares (Rainard et al., 2020). La ausencia de IL-17 detectable en leche no implica necesariamente su falta de participación en la respuesta local, sino que podría reflejar una expresión limitada al nivel celular o tisular que no fue evaluada en este trabajo. Estudios de inmunohistoquímica en vacas con infecciones crónicas naturales han detectado IL-17 en el citoplasma de células epiteliales y en linfocitos del tejido conectivo durante la involución, sugiriendo que la proteína puede permanecer asociada a las estructuras parenquimales sin ser secretada al compartimento luminal (Calvinho & Dallard, 2023b). Sin embargo, la falta de una respuesta detectable de IL-17 en este estudio podría estar indicando una activación subóptima del eje Th17 por parte de las formulaciones vacunales estudiadas, o bien reflejar que la infección generada por la cepa *S. aureus* 26L es incapaz de superar el estado de tolerancia que el hospedador suele establecer con patógenos altamente adaptados (Rainard et al., 2022c).

En el caso de IFN- γ , su presencia en leche presenta mayor variabilidad entre estudios. Kim et al., (2011) reportaron una marcada inducción de IFN- γ en vacas desafiadas con la cepa Newbould 305, durante los primeros 6 días post-infección. Por otro lado, una variante de colonia pequeña SCV Heba3231, asociada a mastitis crónica, no generó cambios detectables en la concentración de esta citoquina, aun cuando el microorganismo persistió en la glándula mamaria, mientras que la cepa parental 3231 sí indujo la expresión de IFN- γ los primeros días post-infección, aunque en menor medida que Newbold 305. Resultados más recientes mostraron que cepas de *S. aureus* con bajo nivel de adaptación a la glándula mamaria inducen una respuesta inflamatoria local más intensa, acompañada de mayores niveles de IFN- γ , mientras que cepas altamente adaptadas muestran una capacidad superior para evadir o atenuar esta respuesta (Engler et al., 2025b). En el presente estudio, la ausencia de IFN- γ en leche es consistente con este patrón descrito para cepas de comportamiento persistente, como *S. aureus* 26L, y sugiere que la infección experimental no desencadenó una activación detectable de mecanismos celulares asociados a la producción de IFN- γ en GM, independientemente del esquema de vacunación evaluado.

En conjunto, el perfil de citoquinas detectado en leche tras el desafío intramamario con la cepa *S. aureus* 26L se caracterizó por una respuesta inflamatoria de baja magnitud, con una inducción transitoria de IL-8 en algunos animales vacunados y una ausencia generalizada de IL-1 β , IL-17 e IFN- γ detectables en el compartimento luminal mamario. Este patrón resulta coherente con lo descrito para cepas de *S. aureus* altamente adaptadas a la glándula mamaria, las cuales tienden a modular o atenuar la activación de respuestas inflamatorias intensas y de tipo celular, favoreciendo el establecimiento de infecciones persistentes y subclínicas. No obstante, la interpretación de estos hallazgos debe realizarse en el contexto de la limitada información disponible sobre la dinámica de citoquinas en leche bovina frente a desafíos intramamarios experimentales, particularmente en

animales vacunados. A su vez, la determinación de citoquinas reguladoras, no abordadas en este estudio, podría aportar información valiosa en futuros ensayos sobre posibles mecanismos de modulación de la respuesta inflamatoria durante la infección.

Cabe mencionar, que las formulaciones vacunales sometidas al ensayo de desafío experimental fueron seleccionadas a partir del análisis de la respuesta inmune sistémica, donde se pudo identificar la capacidad de inducir un perfil predominantemente Th1 con una contribución de Th17. Sin embargo, estos perfiles no se pusieron de manifiesto al analizar la producción de citoquinas en leche. Este comportamiento puede asociarse a que la GM no refleje necesariamente lo observado a nivel sistémico o que deban superarse determinados niveles de respuesta para que las células efectoras estén disponibles adecuadamente a nivel local.

Organización de las poblaciones celulares

Con relación a las poblaciones celulares presentes en la GM que se analizaron y, si bien existen pocos trabajos que hayan caracterizado en detalle los subtipos de células somáticas en la GM bovina durante infecciones experimentales tras inmunizaciones, los resultados obtenidos permiten aportar información valiosa sobre la dinámica de los principales linajes inmunitarios involucrados en la respuesta local. Estudios previos han demostrado que la composición celular de la leche y del infiltrado mamario difiere marcadamente entre glándulas sanas e infectadas, reflejando el tipo e intensidad de la respuesta inmunitaria (Riolet et al., 2001; Schwarz et al., 2011, Wiarda et al., 2025). Estas variaciones pueden estar influenciadas por factores fisiológicos y ambientales, como la etapa y número de lactancia, el estrés, el ordeño o la estación del año, aunque la presencia de IIM constituye el factor más determinante. En glándulas sanas (RCS <100.000 células/mL), la leche contiene principalmente macrófagos (12–46%) y linfocitos (14–80%), con una proporción menor de neutrófilos (6–50%). Dentro de la población linfocitaria, predominan las células T CD8+ sobre las CD4+. Sin embargo, ante un desafío bacteriano como el de *S. aureus*, se activa un reclutamiento masivo de granulocitos, transformando el infiltrado en predominantemente neutrofilico (hasta 90–95%) y provoca una inversión en la relación de linfocitos donde los CD4+ pasan a liderar la respuesta adaptativa local (Taylor et al., 1997; Schwarz et al., 2011). A su vez, en un análisis poblacional, Niedziela et al., (2021) observaron que esta respuesta depende del linaje de *S. aureus*. Mientras que en la infección por *S. aureus* grupo CC151 (asociado a mastitis clínica) mantuvo a los neutrófilos como el tipo celular principal, en el caso de *S. aureus* grupo CC97 mostró una predominancia de macrófagos M1 a las 48 y 168 h post-infección, sugiriendo un mecanismo de evasión inmune en casos subclínicos. Aunque las proporciones de linfocitos disminuyeron al mínimo en ambos modelos debido al aumento de fagocitos, este cambio poblacional fue clave para determinar si la infección progresó hacia la cronicidad o hacia un cuadro clínico severo (Niedziela et al., 2021)

En este trabajo, frente al desafío intramamario con *S. aureus* 26L, se observó una transformación radical del infiltrado celular en la GM, caracterizada por una movilización masiva de granulocitos y una reestructuración de las subpoblaciones de linfocitos T, cuya magnitud y persistencia sugieren una respuesta adaptada a desarrollar un proceso crónico por parte de la cepa utilizada. Todos los grupos evidenciaron una caída inicial en la proporción de linfocitos totales hacia el día 2 pi. Un comportamiento similar ha sido descrito anteriormente como una muerte celular selectiva de células T no específicas durante la fase aguda de la infección, lo que reduce su presencia porcentual frente al flujo masivo de fagocitos (Grönlund et al., 2006). Los autores proponen que este proceso no es meramente un efecto matemático de dilución por la llegada de neutrófilos, sino que involucra mecanismos biológicos activos de lisis y supresión inducidos por el patógeno. Como explican Broeker et al., (2016) y Thammavongsa et al., (2015), *S. aureus* utiliza toxinas como la α -toxina y la leucocidina LukDE (específica al receptor CCR5 presente en linfocitos T humanos y bovinos) para causar lisis directa. Además, la secreción de superantígenos provoca una activación masiva y no específica de hasta el 20% del repertorio de células T, lo que culmina en un estado de anergia o muerte celular programada, mecanismos que impiden el desarrollo de una respuesta específica y eficaz contra el patógeno. En este estudio, los porcentajes de células CD4+ no mostraron diferencias estadísticas globales frente al control en el periodo evaluado, aunque ambas formulaciones mostraron un pico de CD4+ cercano al 20% al día 6 pi sugiriendo una activación local. Se ha establecido que en mastitis por *S. aureus*, los linfocitos CD4+ suelen aumentar significativamente para coordinar la respuesta adaptativa, superando a los CD8+ (Taylor et al., 1997). En cambio, un hallazgo relevante en este estudio fue la disminución significativa de linfocitos CD8+ en la leche del grupo Lip+Man+Rec, manteniendo niveles significativamente menores que el control y el grupo Lip+CpG-ODN+AG2-C16+Rec. Lejos de interpretarse como una debilidad inmunológica, este resultado podría alinearse con lo reportado por Sordillo, (2018) y Engler et al., (2025a) donde plantean una teoría de retención tisular en infecciones crónicas, en la cual las células CD8+ no se liberan al lumen glandular, sino que son retenidas en el parénquima mamario para ejercer su función citotóxica directa contra las células epiteliales que albergan la bacteria de forma intracelular. Dado que *S. aureus* utiliza la internalización como mecanismo de evasión, la permanencia de estas células en el tejido es crítica para el control de la persistencia bacteriana (Grönlund et al., 2006). En este estudio, el grupo Lip+Man+Rec, a pesar de tener los niveles más bajos de CD8+ en leche mostró una tendencia a una caída más pronunciada en el recupero bacteriano y mayor tasa de cuartos negativos al final del estudio.

La respuesta innata fue dominada por el aumento drástico de granulocitos (CH138A+) en todos los grupos tras la infusión. Esta población resultó significativamente superior en el análisis global para el grupo Lip+Man+Rec con respecto al control. Si bien el grupo Lip+CpG-ODN+AG2C16+Rec presentó un pico temprano de activación más pronunciado, solo mostró diferencias significativas

puntuales hacia el día 14 respecto al control sin inmunizar. A su vez, la cinética observada en este estudio, con picos elevados que se mantienen o reaparecen hacia el final del ensayo fue similar a lo observado por Engler et al., (2025) en el transcurso de la infección con una cepa considerada persistente, con algunas diferencias en relación con los períodos de observación. El presente estudio realizó el seguimiento de las poblaciones celulares hasta el día 28 post-infección, iniciando a los 30 días posparto, mientras que Engler et al., (2025a) analizaron la dinámica celular durante la involución activa de la glándula mamaria (período seco), con evaluaciones a los 7, 14 y 21 días post-secado. A pesar de estas diferencias en el estadio fisiológico evaluado, los patrones generales de reclutamiento y persistencia de granulocitos resultaron comparables entre ambos estudios. Además, la permanencia de altos niveles de CH138A+ en los grupos inmunizados sugiere que las células han adquirido un programa transcripcional de activación prolongada, enriquecido en genes de quimiotaxis y respuesta a bacterias Gram-positivas, tal como lo demuestran Wiarda et al., (2025) en casos de mastitis crónica. Sin embargo, el marcado reclutamiento leucocitario persistente no se tradujo en la resolución de la infección, lo que sugiere que la activación celular inducida por la vacunación no fue funcionalmente eficiente, posiblemente debido a la baja disponibilidad de opsoninas locales y a la evasión inmune ejercida por la cepa 26L.

*Impacto de la vacunación sobre la respuesta inmune mamaria frente a *Staphylococcus aureus* 26L*

En conjunto, los perfiles celulares y la respuesta observada en los grupos G3 y G4 sugieren que la vacunación permitió establecer en la glándula mamaria un umbral de alerta inmunológica incrementado, caracterizado por una movilización leucocitaria temprana y sostenida de células CH138A+ tras el desafío intramamario. Esta activación temprana sugiere mecanismos de reconocimiento y reclutamiento celular sensibilizados por la inmunización. Mientras que la respuesta innata (CH138A+) fue persistente en ambos grupos inmunizados, la dinámica de los linfocitos T en el grupo Lip+Man+Rec sugiere una especialización funcional de la respuesta, en la cual el sistema inmune priorizaría la respuesta en el parénquima mamario, posiblemente a través de la retención o acumulación local de linfocitos T CD8+, orientados a enfrentar reservorios bacterianos intracelulares.

Sin embargo, la persistencia de la infección a pesar de los elevados niveles de células CH138A+, pone de manifiesto que esta activación innata no resultó suficiente para lograr la resolución bacteriológica. Este fenómeno puede explicarse por la combinación entre una respuesta efectora incompleta del hospedador y el sofisticado repertorio de mecanismos de evasión desplegado por *S. aureus*. En este sentido, *Staphylococcus aureus* posee múltiples mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedador y reducir la eficacia de los procesos de eliminación bacteriana. Estas estrategias, descritas para cepas adaptadas al bovino, pueden interferir con la resolución de la infección intramamaria incluso cuando se desencadena una respuesta inflamatoria robusta, favoreciendo el establecimiento de infecciones persistentes.

A esta capacidad de evasión se suma la limitada disponibilidad de IgG2 específica en leche, isotipo clave para la opsonización dependiente de neutrófilos. Esta condición podría haber generado un desacople efector en el cual el marcado reclutamiento celular no se traduce en una reducción efectiva de la carga bacteriana, tal como ha sido propuesto por Burton & Erskine, (2003). A pesar de que las células CH138A⁺ logran la ingesta bacteriana, *S. aureus* posee mecanismos que le permiten resistir la muerte intracelular, los cuales neutralizan el estallido respiratorio y limitan la eficacia de las trampas extracelulares de neutrófilos (Thammavongsa et al., 2015). A esto se suma su capacidad para internalizarse y sobrevivir en nichos intracelulares, como células epiteliales y macrófagos, permitiéndole sustraerse tanto de la respuesta humoral como de la actividad bactericida extracelular, favoreciendo el establecimiento de infecciones persistentes (Grönlund et al., 2006; Engler et al., 2022, 2025a). Estos antecedentes ponen en evidencia que un buen inmunógeno, además de generar una respuesta inmune adecuada, debería ser capaz de superar estos mecanismos de evasión.

Desde esta perspectiva, la vacunación parecería haber modulado principalmente la fase de detección y activación temprana de la respuesta inmune, más que los mecanismos finales de eliminación del patógeno. Esto se refleja en el incremento temprano de la carga bacteriana y el RCS en los animales inmunizados durante los primeros días post-desafío, con valores que superaron parcialmente a los del grupo control. No obstante, esta mayor sensibilidad en el reconocimiento no se tradujo en la resolución de la infección. La cepa 26L (CC97), altamente adaptada al hospedador bovino, parece explotar la dinámica inmunológica del compartimento mamario, donde la respuesta humoral está naturalmente sesgada hacia la IgG1 y la exclusión bacteriana dependería críticamente de la sincronización entre inflamación, opsonización y función neutrofílica. En este contexto, la persistencia observada sugiere que el desenlace de la infección no estuvo determinado por una falla en la detección del patógeno, sino por la capacidad del linaje CC97 para modular la inflamación local y consolidar un estado de tolerancia inmunológica compatible con la persistencia subclínica.

En conjunto, estas consideraciones permiten comprender por qué los resultados de la vacunación contra la mastitis estafilocócica han sido históricamente variables e inconsistentes. Tal como se desprende del metaanálisis de Mata et al., (2023), la eficacia de las estrategias vacunales se encuentra condicionada por la diversidad genética y evolutiva del patógeno, la presión selectiva ejercida por el uso de antimicrobianos y la limitada representatividad antigénica de las formulaciones frente a las cepas circulantes en cada rodeo. Asimismo, el momento de aplicación y el estado fisiológico del animal resultan determinantes. La revisión propone que la vacunación contra *S. aureus* debería ser interpretada principalmente como una herramienta destinada a modular la infección y atenuar su impacto productivo, más que como una estrategia capaz de prevenir de manera consistente la colonización intramamaria.

Perspectivas para potenciar la inmunidad por vacunación.

Dado que la glándula mamaria se organiza como un sistema inmune regional y funcionalmente autónomo, el fortalecimiento de la inmunidad local podría beneficiarse de estrategias innovadoras como el protocolo de “*prime and pull*” descrito por Rainard et al., (2022c). Este enfoque combina una inmunización parenteral inicial (*prime*), destinada a generar linfocitos T con experiencia antigénica a nivel sistémico, con una aplicación local del inmunógeno en la GM (*pull*) para reclutar específicamente a dichas células.

Esta estrategia resulta particularmente atractiva porque favorece el establecimiento de linfocitos T de memoria residentes (Trm) en el parénquima mamario, superando la carencia natural de moléculas clásicas de direccionamiento (*homing*) en este órgano. La integración de ambas vías induciría una respuesta protectora mediada por la inmunidad de tipo 3 (Th17), caracterizada por la liberación de IL-17A, IL-17F e IL-22. Estas citoquinas actúan como señales maestras para el reclutamiento masivo e inmediato de neutrófilos y la estimulación del epitelio para secretar péptidos antimicrobianos (Rainard et al., 2020). Al establecer un reservorio local de Trm capaces de responder de manera inmediata ante el primer contacto con el patógeno, estas estrategias podrían limitar la invasión bacteriana de manera temprana, impidiendo que linajes adaptados como el CC97 logren internalizarse en nichos intracelulares y consolidar un estado de persistencia o infección crónica (Rainard et al., 2022c).

En conjunto, estos hallazgos permiten contextualizar la respuesta inducida por la vacunación frente a *S. aureus* en el marco de la compleja inmunobiología de la GM, integrando los efectos de la inmunización sobre la activación inflamatoria local y sus limitaciones frente a la persistencia bacteriana.

CONCLUSIÓN GENERAL

La presente Tesis aborda una investigación que representa un avance significativo en el desarrollo de una plataforma de diseño racional de vacunas de subunidades orientada al control de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus*. Mediante un abordaje multidisciplinario que integró la optimización de antígenos, herramientas de nanotecnología aplicada a sistemas de liberación y la inmunología clínica bovina, se logró caracterizar un inmunógeno prototípico con elevada capacidad inmunogénica que, al mismo tiempo, permitió poner en evidencia la complejidad extrema de los mecanismos de protección en la glándula mamaria (GM).

En una primera instancia, la optimización biotecnológica del proceso de producción permitió la obtención de los factores de virulencia rAt, rBt, rClfA y rFnbpA libres de proteínas de fusión (TRX), una decisión estratégica clave para preservar la conformación nativa de los epítomos y evitar desvíos en la especificidad de la respuesta humoral inducida. En este contexto, la resolución de la insolubilidad de rBt mediante la coexpresión con las chaperonas GroEL–GroES validó el enfoque adoptado, demostrando que es posible producir antígenos complejos y funcionales sin recurrir a etiquetas que puedan comprometer la integridad inmunológica del diseño vacunal.

Desde el punto de vista tecnológico, el empleo de liposomas catiónicos como sistema de delivery evidenció una notable versatilidad. La caracterización fisicoquímica mediante DLS permitió establecer que la incorporación del lipopéptido Gemini AG2C16 no solo aporta una señal inmunoestimulante adicional, sino que ejerce un efecto estabilizador crítico sobre la suspensión coloidal, reduciendo el índice de polidispersidad y contrarrestando la tendencia a la agregación inducida por el CpG-ODN. Esta sinergia entre adyuvantes de última generación permitió obtener formulaciones homogéneas, con un diámetro hidrodinámico compatible con una interacción eficiente con las células presentadoras de antígenos (CPA).

En el modelo de inmunización sistémica, el esquema vacunal propuesto demostró ser altamente eficaz para inducir una respuesta de memoria inmunológica duradera, capaz de reactivarse mediante refuerzos preparto y de sostener niveles elevados de IgG totales, IgG1 e IgG2 séricas específicas frente a los antígenos vacunales. Asimismo, la caracterización del perfil celular mediante ensayos WBA confirmó que las formulaciones, en particular aquellas Lip+Man+Rec o la combinación Lip+CpG-ODN+AG2-C16, favorecen un perfil inmunológico predominantemente Th1, caracterizado por la producción de IFN- γ , con una contribución incipiente de la inmunidad de tipo 3 (Th17), perfiles considerados relevantes para el control de infecciones bacterianas persistentes.

No obstante, el desafío intramamario experimental con la cepa 26L (linaje CC97) puso de manifiesto las limitaciones de la inmunidad sistémica frente a patógenos altamente adaptados al hospedador. Un resultado no esperado de este estudio fue el posible fenómeno de desacople efector en la glándula mamaria. A pesar de que la vacunación sensibilizó este compartimento para un reclutamiento temprano y masivo de granulocitos (CH138A⁺) y sostuvo niveles apreciables de IgG1 específica en leche, la limitada disponibilidad de IgG2 opsonizante en el lumen mamario pudo haber impedido que esta respuesta celular se tradujera en la resolución efectiva de la infección. En este sentido, la ausencia de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β e IFN- γ en leche durante el desafío sugiere que la cepa 26L despliega mecanismos activos de evasión inmune, atenuando la inflamación local y favoreciendo un estado de tolerancia compatible con su persistencia subclínica.

En cuanto a la dinámica celular local, la reducción de linfocitos CD8⁺ en leche observada en el grupo Lip+Man+Rec podría relacionarse con una posible retención tisular de células citotóxicas en el parénquima mamario, orientada al control de nichos bacterianos intracelulares. Sin embargo, esta especialización funcional no resultó suficiente para alcanzar una inmunidad esterilizante, lo que refuerza la noción de que *S. aureus* explota de manera eficiente las barreras fisiológicas de la ubre para evadir la actividad bactericida del hospedador.

Como proyección a futuro, los resultados de esta tesis indican que el éxito de las estrategias vacunales destinadas al control de la mastitis estafilocócica dependerá de la capacidad de superar el aislamiento inmunológico de la glándula mamaria. En este marco, se propone el desarrollo de protocolos de tipo *prime and pull*, que integren la inmunización sistémica con intervenciones locales intramamarias destinadas a reclutar y establecer linfocitos T de memoria residentes (Trm). Esta aproximación permitiría fortalecer la inmunidad de tipo 3 local, favoreciendo una alerta temprana y una respuesta efectora capaz de limitar la colonización y la internalización bacteriana en el epitelio mamario. En conjunto, el presente trabajo no solo aporta una plataforma tecnológica robusta, sino que redefine los criterios de eficacia vacunal en mastitis bovina, posicionando la modulación de la infección y el fortalecimiento de la vigilancia inmunológica local como pilares fundamentales para el control de *S. aureus* bajo el enfoque de Una Salud.

BIBLIOGRAFÍA

- Abhyankar, M. M., Orr, M. T., Lin, S., Suraju, M. O., Simpson, A., Blust, M., Balsler, J. S., Huang, P. W., Guderian, J. A., Stover, C. K., Dienger-Stambaugh, K., Madhavan, S., Petri, W. A., Jr., & Fox, C. B. (2018). Adjuvant composition and delivery route shape immune response quality and protective efficacy of a recombinant vaccine for *Entamoeba histolytica*. *npj Vaccines*, 3(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0060-x>.
- Alabdullah, H. A., Overgaard, E., Scarbrough, D., Williams, J. E., Mohammad Mousa, O., Dunn, G., Bond, L., McGuire, M. A., & Tinker, J. K. (2021). Evaluation of the Efficacy of a Cholera Toxin-Based *Staphylococcus aureus* vaccine against bovine intramammary challenge. *Vaccines*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010006>.
- Allison, D. G. (2003). The Biofilm Matrix. *Biofouling*, 19(2), 139–150. <https://doi.org/10.1080/0892701031000072190>.
- Anderson, A. S., Miller, A. A., Donald, R. G., Scully, I. L., Nanra, J. S., Cooper, D., & Jansen, K. U. (2012). Development of a multicomponent *Staphylococcus aureus* vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(11), 1585-1594. <https://doi.org/10.4161/hv.21872>.
- Azuar, A., Madge, H. Y. R., Boer, J. C., Gonzalez Cruz, J. L., Wang, J., Khalil, Z. G., Deceneux, C., Goodchild, G., Yang, J., Koirala, P., Hussein, W. M., Capon, R. J., Plebanski, M., Toth, I., & Skwarczynski, M. (2022). Poly (hydrophobic amino acids) and liposomes for delivery of vaccine against Group A *Streptococcus*. *Vaccines*, 10(8), 1212. <https://doi.org/10.3390/vaccines10081212>.
- Bagnoli, F., Bertholet, S., & Grandi, G. (2012). Inferring reasons for the failure of *Staphylococcus aureus* vaccines in clinical trials. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00016>.
- Bardiau, M., Caplin, J., Detilleux, J., Graber, H., Moroni, P., Taminiau, B., & Mainil, J. G. (2016). Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary microbiology*, 185, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.010>
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of dairy science*, 89(6), 1877-1895. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1).

- Bartheldyová, E., Knotigová, P. T., Zachová, K., Mašek, J., Kulich, P., Effenberg, R., Zyka, D., Hubatka, F., Kotouček, J., Celechovská, H., Hebda, E., Miller, A. D., Raška, M., Ledneva, T., Šturcová, A., Kobera, L., Abbrent, S., & Turánek, J. (2019). N-Oxy lipid-based click chemistry for orthogonal coupling of mannan onto nanoliposomes prepared by microfluidic mixing: Synthesis of lipids, characterisation of mannan-coated nanoliposomes and in vitro stimulation of dendritic cells. *Carbohydrate polymers*, 207, 521-532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.121>
- Bayyurt, B., Tincer, G., Almacioglu, K., Alpdundar, E., Gursel, M., & Gursel, I. (2017). Encapsulation of two different TLR ligands into liposomes confer protective immunity and prevent tumor development. *Journal of controlled release*, 247, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.004>.
- Benedictus, L., Ravesloot, L., Poppe, K., Daemen, I., Boerhout, E., van Strijp, J., Koets, A., Rutten, V., Jorritsma, R., Cretenet, G., & Eisenberg, S. (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. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1765-9>.
- Bingham, R. J., Rudiño-Piñera, E., Meenan, N. A., Schwarz-Linek, U., Turkenburg, J. P., Höök, M., Mungall, A. J., Brzozowski, A. M., & Potts, J. R. (2008). Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), 12254-12258. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803556105>.
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T., & Klinman, D. M. (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 10(4), 499-511. <https://doi.org/10.1586/erv.10.174>.
- Boerhout, E., Vrieling, M., Benedictus, L., Daemen, I., Ravesloot, L., Rutten, V. P. M. G., van Kessel, K. P. M., Koets, A. P., van Strijp, J. A. G., & Eisenberg, S. W. F. (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. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0243-7>.
- Boerhout, E. M., Koets, A. P., Mols-Vorstermans, T. G., Nuijten, P. J., Hoeijmakers, M. J., Rutten, V. P., & Bijlsma, J. J. (2018). The antibody response in the bovine mammary gland is influenced by the adjuvant and the site of subcutaneous vaccination. *Veterinary research*, 49(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0521-2>
- Breyne, K., Honaker, R. W., Hobbs, Z., Richter, M., Żaczek, M., Spangler, T., Stegelmeier, B., Rauvaud, J. P., Balyozian, A., March, J. B., Meyer, E., & Mokres, L. (2017). Efficacy and safety of a bovine-associated *Staphylococcus aureus* phage cocktail in a murine model of mastitis. *Frontiers in microbiology*, 8, 2348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02348>.
- Bronzo, V., Lopreiato, V., Riva, F., Amadori, M., Curone, G., Addis, M. F., Cremonesi, P., Moroni, P., Trevisi, E., & Castiglioni, B. (2020). The role of innate immune response and microbiome

in resilience of dairy cattle to disease: the mastitis model. *Animals*, 10(8), 1397. <https://doi.org/10.3390/ani10081397>.

- Brown, A.F., Murphy, A.G., Lalor, S.J., Leech, J.M., O’Keeffe, K.M., Mac Aogáin, M., O’Halloran, D.P., Lacey, K.A., Tavakol, M., Hearnden, C.H., & Fitzgerald-Hughes, D. (2015). Memory Th1 cells are protective in invasive *Staphylococcus aureus* infection. *PLoS pathogens*, 11(11), e1005226. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005226>.
- Buonsanti, C., & D’Oro, U. (2017). Discovery of immune potentiators as vaccine adjuvants. In F. E. Schijns & D. T. O’Hagan (Eds.), *Immunopotentiators in modern vaccines* (2nd ed., pp. 85–104). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00005-0>.
- Burke, F. M., McCormack, N., Rindi, S., Speziale, P., & Foster, T. J. (2010). Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. *BMC microbiology*, 10(1), 160. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-160>
- Burton, J. L., & Erskine, R. J. (2003). Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 19(1), 1-45. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00073-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00073-7).
- Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Tuchscher, L. P., Barbagelata, M. S., Lattar, S. M., Calvinho, L., & Sordelli, D. O. (2007). Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infection and immunity*, 75(2), 886-891. <https://doi.org/10.1128/iai.01215-06>.
- C Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V., & Harding, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *The Journal of experimental medicine*, 186(10), 1623-1631. <https://doi.org/10.1084/jem.186.10.1623>.
- Calvinho, L. F. (2019). Mastitis bovina: evolución del control en Argentina y nuevos horizontes de investigación. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, 73, 151-165. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/87779>.
- Calvinho, L. F., & Dallard, B. E. (2023a). *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infections in dairy cows: Pathogen-specific characteristics. *CABI Reviews*, (2023). <https://doi.org/10.1079/cabireviews.2023.0007>
- Calvinho, L. F., & Dallard, B. E. (2023b). Host immune response factors associated with *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infections. *CABI Reviews*, (2023). <https://doi.org/10.1079/cabireviews.2023.0013>.
- Calvinho, L., Chaves, J., Pol, M., & Tirante, L. (2024). Evolución del control de mastitis bovina en Argentina en los últimos 20 años. *Methodo Investigación Aplicada a las Ciencias Biológicas*, 9. [https://doi.org/10.22529/me.2024.9S\(2\)03](https://doi.org/10.22529/me.2024.9S(2)03)
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., & de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis

of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>

- Camussone, C. M., & Calvinho, L. F. (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. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7).
- Camussone, C. M., Veaute, C. M., Porporatto, C., Morein, B., Marcipar, I. S., & Calvinho, L. F. (2013). Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant. *Journal of dairy research*, 80(1), 72-80. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000593>.
- Camussone, C. M., Veaute, C. M., Pujato, N., Morein, B., Marcipar, I. S., & Calvinho, L. F. (2014a). Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. *Research in veterinary science*, 96(1), 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.10.004>.
- Camussone, C. M., Pujato, N., Renna, M. S., Veaute, C. M., Morein, B., Marcipar, I. S., & Calvinho, L. F. (2014b). 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 162(3-4), 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.10.004>.
- Camussone, C. M., Molineri, A. I., Signorini, M. L., Neder, V. E., Vitulich, C. A., & Calvinho, L. F. (2020). Risk factors of *S. aureus* intramammary infection in pre partum dairy heifers under grazing conditions and molecular characterization of isolates from heifers and cows. *Journal of Dairy Research*, 87(1), 82-88. <https://doi.org/10.1017/S0022029919001018>.
- Camussone, C. M., Reidel, I. G., Molineri, A. I., Cicotello, J., Miotti, C., Archilla, G. S., Suárez Archilla, G., Veaute, C., Pujato, N., & Calvinho, L. F. (2022). Efficacy of immunization with a recombinant *S. aureus* vaccine formulated with liposomes and ODN-CpG against natural *S. aureus* intramammary infections in heifers and cows. *Research in Veterinary Science*, 145, 177-187. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.014>.
- Chang, B. S., Moon, J. S., Kang, H. M., Kim, Y. I., Lee, H. K., Kim, J. D., Lee, I. S., Joo, Y. S., & Park, Y. H. (2008). Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine*, 26(17), 2081-2091. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.043>.
- Chatzikleantous, D., O'Hagan, D. T., & Adamo, R. (2021). Lipid-based nanoparticles for delivery of vaccine adjuvants and antigens: toward multicomponent vaccines. *Molecular pharmaceutics*, 18(8), 2867-2888. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00447>.

- Cheung, G. Y., Wang, R., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., & Otto, M. (2011). Role of the accessory gene regulator agr in community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and immunity*, 79(5), 1927-1935. <https://doi.org/10.1128/iai.00046-11>.
- Cheung, G. Y., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>.
- Clegg, J., Soldaini, E., McLoughlin, R. M., Rittenhouse, S., Bagnoli, F., & Phogat, S. (2021). *Staphylococcus aureus* vaccine research and development: the past, present and future, including novel therapeutic strategies. *Frontiers in immunology*, 12, 705360. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705360>.
- Correa, A., & Oppezzo, P. (2011). Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: Advantages of high throughput screening. *Biotechnology journal*, 6(6), 715-730. <https://doi.org/10.1002/biot.201100025>.
- Correa, A., Ortega, C., Obal, G., Alzari, P., Vincentelli, R., & Oppezzo, P. (2014). Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Frontiers in microbiology*, 5, 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00067>.
- Côté-Gravel, J., & Malouin, F. (2019). Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *Journal of dairy science*, 102(5), 4727-4740. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15272>.
- Cucarella, C., Tormo, M. A., Úbeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J. R. (2004). Role of biofilm associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 72(4), 2177-2185. <https://doi.org/10.1128/iai.72.4.2177-2185.2004>.
- Das, B., Kumar, B., Begum, W., Bhattarai, A., Mondal, M. H., & Saha, B. (2022). Comprehensive review on applications of surfactants in vaccine formulation, therapeutic and cosmetic pharmacy and prevention of pulmonary failure due to COVID-19. *Chemistry Africa*, 5(3), 459-480. <https://doi.org/10.1007/s42250-022-00345-0>.
- Dauty, E., Remy, J. S., Blessing, T., & Behr, J. P. (2001). Dimerizable cationic detergents with a low cmc condense plasmid DNA into nanometric particles and transfect cells in culture. *Journal of the American Chemical Society*, 123(38), 9227-9234. <https://doi.org/10.1021/ja015867r>.
- Demontier, E., Dubé-Duquette, A., Brouillette, E., Larose, A., Ster, C., Lucier, J.-F., Rodriguez, P., Jacques, M., Gobi, J.-P., Lacasse, P., & Malouin, F. (2021). Relative virulence of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis strains representing the main Canadian spa types and clonal complexes as determined using in vitro and in vivo mastitis models. *Journal of Dairy Science*, 104(11), 11904-11921. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19904>.

- Depelsenaire, A. C. I., Kendall, M. A. F., Young, P. R., & Muller, D. A. (2017). Introduction to vaccines and vaccination. In *Micro and nanotechnology in vaccine development* (pp. 47-62). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39981-4.00003-8>.
- Di Bella, S., Marini, B., Stroffolini, G., Geremia, N., Giacobbe, D. R., Campanile, F., Grilli, A., Bassetti, M., Luzzati, R., & di Masi, A. (2025). The virulence toolkit of *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review of toxin diversity, molecular mechanisms, and clinical implications. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10096-025-05148-y>.
- Dobrovolskaia, M. A., Shurin, M., & Shvedova, A. A. (2016). Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicology and applied pharmacology*, 299, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.022>.
- Dominguez-Arca, V., Sabin, J., Garcia-Rio, L., Bastos, M., Taboada, P., Barbosa, S., & Prieto, G. (2022). On the structure and stability of novel cationic DPPC liposomes doped with gemini surfactants. *Journal of Molecular Liquids*, 366, 120230. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120230>.
- Edwards, A. M., Potts, J. R., Josefsson, E., & Massey, R. C. (2010). *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS pathogens*, 6(6), e1000964. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000964>.
- Eftaiha, A. A. F., Brunet, S. M., & Paige, M. F. (2012). Influence of film composition on the morphology, mechanical properties, and surfactant recovery of phase-separated phospholipid-perfluorinated fatty acid mixed monolayers. *Langmuir*, 28(43), 15150-15159. <https://doi.org/10.1021/la3026655>.
- Engler, C., Renna, M. S., Beccaria, C., Silvestrini, P., Pirola, S. I., Pereyra, E. A., Sacco, S. C., Renzi, G., Calvinho, L. F., & Dallard, B. E. (2022). Differential immune response to two *Staphylococcus aureus* strains with distinct adaptation genotypes after experimental intramammary infection of dairy cows. *Microbial Pathogenesis*, 172, 105789. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105789>.
- Engler, C., Pirola, S., Beccaria, C., Simonutti, V., Baravalle, C., Pereyra, E. A. L., Camussone, C. & Renna, M. S. (2025a). Kinetics of local and systemic immune cell populations in *Staphylococcus aureus* chronically infected bovine mammary gland during active involution. *Journal of Dairy Research*, 1-8. <https://doi.org/10.1017/S0022029925101064>.
- Engler, C., Simonutti, V. L., Battaglia, I. G., Pirola, S. I., Beccaria, C., Silvestrini, P., Camussone, C. & Renna, M. S. (2025b). Characterization of the WC1+ $\gamma\delta$ T lymphocyte population after experimental intramammary infection of dairy cows with two *Staphylococcus aureus* strains with distinct adaptation genotypes. *Microbial Pathogenesis*, 108263. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.108263>.

- Ezzat Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2014). The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of veterinary medicine*, 2014(1), 659801. <https://doi.org/10.1155/2014/659801>.
- Farrow, M. F., & Rubin, E. J. (2008). Function of a mycobacterial major facilitator superfamily pump requires a membrane-associated lipoprotein. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1783-1791. <https://doi.org/10.1128/JB.01046-07>
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews microbiology*, 12(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.
- Foster, T. J. (2016). The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(12), 1923-1931. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2763-0>.
- Foster, T. J. (2019). The MSCRAMM family of cell-wall-anchored surface proteins of gram-positive cocci. *Trends in microbiology*, 27(11), 927-941. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.06.007>.
- Ganesh, V. K., Rivera, J. J., Smeds, E., Ko, Y.-P., Bowden, M. G., Revreau, M., Visai, L., Terman, A., Hook, M., & Narayana, S. V. L. (2008). A structural model of the *Staphylococcus aureus* ClfA–fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics. *PLoS pathogens*, 4(11), e1000226. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000226>.
- Germon, P., & Martins, R. P. (2023). Immune defences of the mammary gland in dairy ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 58, 4-14. <https://doi.org/10.1111/rda.14372>.
- Goswami, R., O'Hagan, D. T., Adamo, R., & Baudner, B. C. (2021). Conjugation of mannans to enhance the potency of liposome nanoparticles for the delivery of RNA vaccines. *Pharmaceutics*, 13(2), 240. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020240>.
- Grippo, L. D., Reidel, I. G., García, M. I., Streu, A., Müller, D. M., & Veaute, C. M. (2020). Gemini lipopeptides as vaccine adjuvants: a new role for these versatile carriers. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 9(2), 159. <https://doi.org/10.7774/cevr.2020.9.2.159>.
- Grumann, D., Nübel, U., & Bröker, B. M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins—their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 583-592. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.013>.
- Günther, J., Petzl, W., Bauer, I., Ponsuksili, S., Zerbe, H., Schuberth, H. J., Brunner, R. M., Seyfert, H. M., & Wimmers, K. (2017). Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli mastitis*: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Scientific Reports*, 7(1), 4811. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05107-4>.
- Gupta, A., & Gupta, G. S. (2022). Applications of mannose-binding lectins and mannan glycoconjugates in nanomedicine. *Journal of Nanoparticle Research*, 24(11), 228. <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05594-1>.

- Hajissa, K., Zakaria, R., Suppian, R., & Mohamed, Z. (2019). Epitope-based vaccine as a universal vaccination strategy against *Toxoplasma gondii* infection: A mini-review. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f329>.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Müller, T., Latz, E., & Wagner, H. (2008). The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*, 28(3), 315-323. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.013>.
- Hine, B. C., Hunt, P. W., & Colditz, I. G. (2019). Production and active transport of immunoglobulins within the ruminant mammary gland. *Veterinary immunology and immunopathology*, 211, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.04.006>.
- Hoekstra, J., Rutten, V. P. M. G., Sommeling, L., Van Werven, T., Spaninks, M., Duim, B., Benedictus, L., Vrieling, M., & Koop, G. (2018). High production of LukMF' in *Staphylococcus aureus* field strains is associated with clinical bovine mastitis. *Toxins*, 10(5), 200. <https://doi.org/10.3390/toxins10050200>.
- Jaswal, S., Jena, M. K., Anand, V., Jaswal, A., Kancharla, S., Kolli, P., Swain, D. K., Sahu, A. R., Verma, R.P., Kumar, S., & Mohanty, A. K. (2022). Critical review on physiological and molecular features during bovine mammary gland development: recent advances. *Cells*, 11(20), 3325. <https://doi.org/10.3390/cells11203325>.
- Joshi, A., & McNeely, T. B. (2013). Developing a Universal *Staphylococcus aureus* Vaccine: Why Aren't We There Yet. *Intern Med*, 3(2), 1-7. <http://dx.doi.org/10.4172/2165-8048.1000126>.
- Keane, O. M. (2019). Symposium review: Intramammary infections - Major pathogens and strain-associated complexity. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4713-4726. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15326>.
- Kehrl Jr, M. E., & Harp, J. A. (2001). Immunity in the mammary gland. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*, 17(3), 495-516. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30003-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30003-7).
- Kerro Dego, O., & Vidlund, J. (2024). Staphylococcal mastitis in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1356259. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1356259>.
- Khatonier, R., & Khan, A. M. (2025). Genetic variations in interleukin-17 gene: a review on SNP rs2275913 and its clinical implications. *Gene*, 149708. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2025.149708>.
- Kim, H. K., Thammavongsa, V., Schneewind, O., & Missiakas, D. (2012). Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in microbiology*, 15(1), 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.012>.
- Knight-Jones, T. J. D., Edmond, K., Gubbins, S., & Paton, D. J. (2014). Veterinary and human vaccine evaluation methods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1784), 20132839. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2839>.

- Kornuta, C.A., Cheuquepán, F., Bidart, J.E., Soria, I., Gammella, M., Quattrocchi, V., Hecker, Y.P., Moore, D.P., Romera, S.A., Marin, M.S., and Zamorano, P.I. (2022). TLR activation, immune response and viral protection elicited in cattle by a commercial vaccine against Bovine Herpesvirus-1. *Virology*, 566, 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.11.014>.
- Krieg, A. M. (2007). Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1184-1194. <https://doi.org/10.1172/JCI31414>.
- Kumar, S., Anselmo, A. C., Banerjee, A., Zakrewsky, M., & Mitragotri, S. (2015). Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 220, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.069>
- Kumar, P., Dar, Y., & Kumar, A. (2022). Functional anatomy of cow mammary glands with special reference to its defence mechanism. *Int. J. Cow Sci*, 6(1), 30-31. <https://doi.org/10.18231/j.ijcs.2022.005>.
- Lai, C., Duan, S., Ye, F., Hou, X., Li, X., Zhao, J., Yu, X., Hu, Z., Tang, Z., Mo, F., Yang, X., & Lu, X. (2018). The enhanced antitumor-specific immune response with mannose- and CpG-ODN-coated liposomes delivering TRP2 peptide. *Theranostics*, 8(6), 1723–1739. <https://doi.org/10.7150/thno.22056>
- LaVallie, E. R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A., & McCoy, J. M. (2000). [21] Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. In *Methods in enzymology* (Vol. 326, pp. 322-340). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26063-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26063-1).
- Li, P., Chen, S., Jiang, Y., Jiang, J., Zhang, Z., & Sun, X. (2013). Dendritic cell targeted liposomes–protamine–DNA complexes mediated by synthetic mannosylated cholesterol as a potential carrier for DNA vaccine. *Nanotechnology*, 24(29), 295101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/29/295101>.
- Lin, L., Ibrahim, A.S, Xu, X., Farber, J.M., Avanesian, V., Baquir, B., Fu, Y., French, S.W., Edwards, J.E. Jr., and Spellberg, B. (2009). Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS pathogens*, 5(12), e1000703. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000703>.
- Lin, Z., & Rye, H. S. (2006). GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 41(4), 211-239. <https://doi.org/10.1080/10409230600760382>.
- Lindsay, J. A. (2014). *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(2), 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.010>.
- Löffler, B., Tuchscher, L., Niemann, S., & Peters, G. (2014). *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(2), 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.011>.

- Loughman, A., Sweeney, T., Keane, F. M., Pietrocola, G., Speziale, P., & Foster, T. J. (2008). Sequence diversity in the A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *BMC microbiology*, 8(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-74>.
- Marasini, N., Ghaffar, K. A., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2017). Liposomes as a vaccine delivery system. In *Micro and Nanotechnology in vaccine Development* (pp. 221-239). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39981-4.00012-9>.
- Mata, F., Jesus, M. S., Pinto, R. P., & Mata, A. (2023). A meta-analysis of the mastitis vaccination efficacy in dairy cattle. *Open Veterinary Journal*, 13(2), 179-187. <https://doi.org/10.4314/ovj.v13i2>.
- Melchior, M. B., van Osch, M. H. J., Graat, E. A. M., van Duijkeren, E., Mevius, D. J., Nielen, M., Gaastra, W., & Fink-Gremmels, J. (2009). Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.004>.
- Mena, A., Nichani, A. K., Popowych, Y., Ioannou, X. P., Godson, D. L., Mutwiri, G. K., Hecker, R., Babiuk, L. A., & Griebel, P. (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. <https://doi.org/10.1089/154545703322460621>.
- Menichetti, B. T., Garcia-Guerra, A., Lakritz, J., Weiss, W. P., Velez, J. S., Bothe, H., Mihai, G., Piñeiro, J. M., & Schuenemann, G. M. (2021). Effects of prepartum vaccination timing relative to pen change with an acidogenic diet on serum and colostrum immunoglobulins in Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 104(10), 11072-11081. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20243>.
- Middleton, J. R., Ma, J., Rinehart, C. L., Taylor, V. N., Luby, C. D., & Stevens, B. J. (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. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001354>.
- Middleton, J. R. (2008). *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert review of vaccines*, 7(6), 805-815. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.6.805>
- Molineri, A. I., Camussone, C., Zbrun, M. V., Archilla, G. S., Cristiani, M., Neder, V., Calvino L & Signorini, M. (2021). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. *Preventive veterinary medicine*, 188, 105261. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105261>.
- Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology*, 104(3), 365-376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.

- Mota-Rojas, D., Napolitano, F., Chay-Canul, A., Ghezzi, M., Braghieri, A., Domínguez-Oliva, A., Braghieri, A., Villanueva-García, D., Guerrero-Legarreta, I., Bertoni, A., Lezama-García, K., Mora-Medina, P., Gómez-Prado, J., Morales-Cantero, A., & Barile, V. L. (2024). Anatomy and physiology of water buffalo mammary glands: an anatomofunctional comparison with dairy cattle. *Animals*, 14(7), 1066. <https://doi.org/10.3390/ani14071066>.
- Mulongo, M., Prysliak, T., & Perez-Casal, J. (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. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.055>.
- Murphy, M. P., Niedziela, D. A., Leonard, F. C., & Keane, O. M. (2019). The in vitro host cell immune response to bovine-adapted *Staphylococcus aureus* varies according to bacterial lineage. *Scientific reports*, 9(1), 6134. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42424-2>.
- Mutwiri, G. K., Nichani, A. K., Babiuk, S., & Babiuk, L. A. (2004). Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of controlled release*, 97(1), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.02.022>.
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Rouhani, S. M. R., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. In *Veterinary research forum* (Vol. 4, No. 3, p. 179).
- Nickerson, S. C.; Owens, W.E.; Tomita, G.M. y Widel, P.W. (1999) Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving. *Large Anim. Pract.* 20:16-28.
- Nickerson, S.C. Akers, R.M. (2011). Mammary Gland Anatomy, Editor(s): John W. Fuquay, Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Academic Press, 2011, Pages 328–337, ISBN 9780123744074, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00290-9>.
- Niedziela, D. A., Murphy, M. P., Grant, J., Keane, O. M., & Leonard, F. C. (2020). Clinical presentation and immune characteristics in first-lactation Holstein-Friesian cows following intramammary infection with genotypically distinct *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of dairy science*, 103(9), 8453-8466. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17433>.
- Niedziela, D. A., Cormican, P., Foucras, G., Leonard, F. C., & Keane, O. M. (2021). Bovine milk somatic cell transcriptomic response to *Staphylococcus aureus* is dependent on strain genotype. *BMC genomics*, 22(1), 796. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08135-7>.
- Nishimura, M., Kohara, J., Kuroda, Y., Hiasa, J., Tanaka, S., Muroi, Y., Kojima, N., Furuoka, H., & Nishikawa, Y. (2013). Oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle. *Vaccine*, 31(35), 3528-3535. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.083>.
- Novoa, M. B., Sarli, M., Reidel, I. G., Veaute, C., Valentini, B., & Primo, M. E. (2021). *Neospora caninum* truncated recombinant proteins formulated with liposomes and CpG-ODNs

triggered a humoral immune response in cattle after immunisation and challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 238, 110285. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110285>.

- O'Brien, E. C., & McLoughlin, R. M. (2019). Considering the 'alternatives' for next-generation anti-Staphylococcus aureus vaccine development. *Trends in molecular medicine*, 25(3), 171-184. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.12.010>.
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10(6), 252. <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>.
- Oliver, S. P., Gonzalez, R. N., Hogan, J. S., Jayarao, B. M., & Owens, W. E. (2004). Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. *National Mastitis Council, Verona, WI*.
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Current opinion in microbiology*, 17, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of infection*, 54(4), 399-409. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.06.010>.
- Pan, L., Simu, C., Yuhong, J., Jiayu, J., Zhirong, Z., & Sun Xun, E. (2013). Dendritic cell targeted liposomes-protamine-DNA complexes mediated by synthetic mannosylated cholesterol as a potential carrier for DNA vaccine. *Nanotechnology (Print)*, 24. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/29/295101>.
- Pandey, Y., Taluja, J. S., Vaish, R., Pandey, A., Gupta, N., & Kumar, D. (2018). Gross anatomical structure of the mammary gland in cow. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4), 728-733.
- Pati, R., Shevtsov, M., & Sonawane, A. (2018). Nanoparticle vaccines against infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 2224. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02224>.
- Pereira, U. P., Oliveira, D. G. S., Mesquita, L. R., Costa, G. M., & Pereira, L. J. (2011). Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Veterinary microbiology*, 148(2-4), 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.003>.
- Petkar, K. C., Patil, S. M., Chavhan, S. S., Kaneko, K., Sawant, K. K., Kunda, N. K., & Saleem, I. Y. (2021). An overview of nanocarrier-based adjuvants for vaccine delivery. *Pharmaceutics*, 13(4), 455. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040455>.
- Petrovski, K. R., Trajcev, M., & Buneski, G. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Journal of the South African veterinary association*, 77(2), 52-60.
- Pinheiro, L., & Faustino, C. (2017). Amino acid-based surfactants for biomedical applications. *Application and characterization of surfactants*, 6, 111-133. <https://doi.org/10.5772/67977>.

- Ponnuraj, K., Bowden, M. G., Davis, S., Gurusiddappa, S., Moore, D., Choe, D., Xu, Y., Hook, M., & Narayana, S. V. (2003). A “dock, lock, and latch” structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell*, *115*(2), 217-228. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00809-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00809-2).
- Porcherie, A., Gilbert, F. B., Germon, P., Cunha, P., Trotreau, A., Rossignol, C., Gormley, E., Fitzgerald, J. R., Foucras, G., & Rainard, P. (2016). IL-17A is an important effector of the immune response of the mammary gland to *Escherichia coli* infection. *The Journal of Immunology*, *196*(2), 803-812. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500705>
- Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., & Costa, L. (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. *Veterinary immunology and immunopathology*, *134*(3-4), 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.020>.
- Pujato, N., Camussone, C. M., Renna, M. S., Perrig, M. S., Morein, B., Calvino, L. F., & Marcipar, I. S. (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. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.03.005>.
- Rainard, P., & Riollet, C. (2003). Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction nutrition development*, *43*(5), 439-457. <https://doi.org/10.1051/rnd:2003031>.
- Rainard, P., & Riollet, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary research*, *37*(3), 369-400. <https://dx.doi.org/10.1051/vetres:2006007>.
- Rainard, P., Cunha, P., Ledresseur, M., Staub, C., Touze, J. L., Kempf, F., Gormley, E., Fitzgerald, J. R., Gilbert, F. B., & Foucras, G. (2015). Antigen-specific mammary inflammation depends on the production of IL-17A and IFN- γ by bovine CD4⁺ T lymphocytes. *PloS one*, *10*(9), e0137755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137755>.
- Rainard, P., Foucras, G., Fitzgerald, J. R., Watts, J. L., Koop, G., & Middleton, J. R. (2018). Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and emerging diseases*, *65*, 149-165. <https://doi.org/10.1111/tbed.12698>.
- Rainard, P., Cunha, P., Martins, R. P., Gilbert, F. B., Germon, P., & Foucras, G. (2020). Type 3 immunity: a perspective for the defense of the mammary gland against infections. *Veterinary Research*, *51*(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00852-3>.
- Rainard, P., Gilbert, F. B., Germon, P., & Foucras, G. (2021). Invited review: a critical appraisal of mastitis vaccines for dairy cows. *Journal of dairy science*, *104*(10), 10427-10448. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20434>.

- Rainard, P., Foucras, G., & Martins, R. P. (2022a). Adaptive cell-mediated immunity in the mammary gland of dairy ruminants. *Frontiers in veterinary science*, *9*, 854890. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.854890>.
- Rainard, P., Gilbert, F. B., & Germon, P. (2022b). Immune defenses of the mammary gland epithelium of dairy ruminants. *Frontiers in immunology*, *13*, 1031785. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031785>.
- Rainard, P., Gilbert, F. B., Martins, R. P., Germon, P., & Foucras, G. (2022c). Progress towards the elusive mastitis vaccines. *Vaccines*, *10*(2), 296. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020296>.
- Rambault, M., Gilbert, F. B., Roussel, P., Tessier, A., David, V., Germon, P., Foucras, G., Rainard, P., & Remot, A. (2023). Neutrophils expressing major histocompatibility complex class II molecules circulate in blood and milk during mastitis and show high microbicidal activity. *Journal of dairy science*, *106*(6), 4245-4256. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22728>.
- Rao, M., Peachman, K. K., & Alving, C. R. (2020). Liposome formulations as adjuvants for vaccines. In *Nanoparticles for Rational Vaccine Design* (pp. 1-28). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2020_227.
- Reidel, I. G., García, M. I., González, V., Giorello, A., Calvino, L. F., Gennaro, A.M., & Veaute, C. (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)
- Reidel, I. G., Camussone, C., Archilla, G. A. S., Calvino, L. F., & Veaute, C. (2019). Liposomal and CpG-ODN formulation elicits strong humoral immune responses to recombinant *Staphylococcus aureus* antigens in heifer calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *212*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.04.011>.
- Reidel, I.G., Curti, C.C., Dorémus, L., Béré, E., Delwail, A., Russi, R.C., Lecron, J.C., Morel, F., García, M.I., Müller, D.M., & Jégou, J.F. (2024). Liposomal co-encapsulation of a novel gemini lipopeptide and a CpG-ODN induces a strong Th1 response with the co-activation of a Th2/Th17 profile and high antibody levels. *Vaccine*, *42*(8), 1953-1965. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.02.011>.
- Renna, M. S., Pereyra, E. A., Baravalle, C., Camussone, C. M., Dallard, B. E., Marcipar, I. S., & Calvino, L. F. (2014). Functional role of antibodies generated in heifers through immunization with *Staphylococcus aureus* vaccines in invasion and phagocytosis assays. *FEMS Microbiology Letters*, *360*(1), 62-69. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12588>.
- Riollet, C., Rainard, P., & Poutrel, B. (2002a). Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. In J. A. Mol & R. A. Clegg (Eds.), *Biology of the mammary gland* (Vol. 480, pp. 247–258). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_30

- Riollet, C., Rainard, P., & Poutrel, B. (2000b). Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(2), 161–167. <https://doi.org/10.1128/cdli.7.2.161-167.2000>.
- Rossi, B. F., Bonsaglia, E. C., Pantoja, J. C., Santos, M. V., Gonçalves, J. L., Júnior, A. F., & Rall, V. L. (2021). Association between the accessory gene regulator (*agr*) group and the severity of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 3564-3568. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19275>.
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of dairy science*, 100(12), 10381-10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.
- Saran, A., & Chaffer, M. (2000). Mastitis y calidad de leche. In *Mastitis y calidad de leche* (pp. xiii-194).
- Saravanan, P., Sreenivasa, B.P., Selvan, R.T., Basagoudanavar, S.H., Hosamani, M., Reddy, N.D., Nathanielsz, J., Derozier, C., and Venkataramanan, R. (2015). Protective immune response to liposome adjuvanted high potency foot-and-mouth disease vaccine in Indian cattle. *Vaccine*, 33(5), 670-677. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.008>.
- Scali, F., Camussone, C., Calvinho, L. F., Cipolla, M., & Zecconi, A. (2015). Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine?. *Research in veterinary science*, 100, 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.019>.
- Schukken, Y. H., Leslie, K. E., Barnum, D. A., Mallard, B. A., Lumsden, J. H., Dick, P. C., Vessie, G. H., Ross, P. S., & Kehrli, M. E. (1999). Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2393-2401. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75490-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75490-1).
- Schukken YH, Bronzo V, Locatelli C, Pollera C, Rota N, Casula A, Testa F, Scaccabarozzi L, March R, Zalduendo D, Guix R, Moroni P. (2014). Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *Journal of dairy science*, 97(8), 5250-5264. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8008>.
- Shishido, S. N., Varahan, S., Yuan, K., Li, X., & Fleming, S. D. (2012). Humoral innate immune response and disease. *Clinical immunology*, 144(2), 142-158.
- Shkreta, L., Talbot, B. G., Diarra, M. S., & Lacasse, P. (2004). Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine*, 23(1), 114-126. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.05.002>.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial cell factories*, 14(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>.

- Smith, E.M., Green, L.E., Medley, G.F., Bird, H.E., Fox, L.K. et al. (2005). Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(9), 4737-4743. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4737-4743.2005>.
- Sordillo, L. M., & Streicher, K. L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 7(2), 135-146. <https://doi.org/10.1023/A:1020347818725>.
- Sordillo, L. M. (2018). Symposium review: Oxylipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5629-5641. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13855>.
- Stemberk, V., Jones, R. P., Moroz, O., Atkin, K. E., Edwards, A. M., Turkenburg, J. P., Leech, A. J., Massey, R. C., Brzozowski, A. M., & Potts, J. R. (2014). Evidence for steric regulation of fibrinogen binding to *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A (FnBPA). *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12842-12851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.543546>.
- Ster, C., Allard, M., Côté-Gravel, J., Boulanger, S., Lacasse, P., & Malouin, F. (2021). Immune and experimental infection responses of dairy cows vaccinated with the combination of six *Staphylococcus aureus* proteins that are expressed during bovine intramammary infection and a triple adjuvant. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 238, 110290. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110290>.
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, 8(4), 409-427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M., & Li, S. (2018). Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (agr) system. *Frontiers in microbiology*, 9, 55. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00055>.
- Tandrup Schmidt, S., Foged, C., Smith Korsholm, K., Rades, T., & Christensen, D. (2016). Liposome-based adjuvants for subunit vaccines: formulation strategies for subunit antigens and immunostimulators. *Pharmaceutics*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8010007>.
- Telfer, J. C., & Baldwin, C. L. (2015). Bovine gamma delta T cells and the function of gamma delta T cell specific WC1 co-receptors. *Cellular immunology*, 296(1), 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.05.003>.
- Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature Reviews Microbiology*, 13(9), 529-543. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3521>.
- Titze, I., Lehnerr, T., Lehnerr, H., & Krömker, V. (2020). Efficacy of bacteriophages against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Pharmaceutics*, 13(3), 35. <https://doi.org/10.3390/ph13030035>.

- Tursunov, K., Tokhtarova, L., Kanayev, D., Mustafina, R., & Mukantayev, K. (2022). Effect of thioredoxin on the immunogenicity of the recombinant P32 protein of lumpy skin disease virus. *Veterinary World*, 15(10), 2384. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2384-2390>.
- Usman, T., Wang, Y., Liu, C., He, Y., Wang, X., Dong, Y., ... & Yu, Y. (2017). Novel SNPs in IL-17F and IL-17A genes associated with somatic cell count in Chinese Holstein and Inner-Mongolia Sanhe cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0137-1>.
- Vedelago, G., Palacios, L. M., Castell, S. D., Marin, C., Ruiz Moreno, F. N., Felici, M. E., Dho, N. D., Allemandi, D. A., Palma, S.D., Morón, G., Bessone F. A., Alustiza F. E., Crespo, M.I. & Maletto, B. A. (2025). Differential innate immune activation by four different CpG-ODNs in porcine and murine cells: Implications for vaccine design. *Research in Veterinary Science*, 105692. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105692>.
- Vidlund, J., Gelalcha, B. D., Gillespie, B. E., Agga, G. E., Schneider, L., Swanson, S. M., Prado, M. E., Kerro Dego, O., & Dego, O. K. (2024). Efficacy of novel staphylococcal surface associated protein vaccines against *Staphylococcus aureus* and *non-aureus staphylococcal* mastitis in dairy cows. *Vaccine*, 42(6), 1247-1258. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.01.067>.
- Waage, S., Skei, H. R., Rise, J., Rogdo, T., Sviland, S., & Ødegaard, S. A. (2000). Outcome of clinical mastitis in dairy heifers assessed by reexamination of cases one month after treatment. *Journal of dairy science*, 83(1), 70-76. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74857-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74857-0).
- Wadström, T., & Möllby, R. (1971). Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*: VII. Studies on β -haemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 242(1), 308-320. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(71\)90110-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(71)90110-0).
- Wagner, A., Platzgummer, M., Kreismayr, G., Quendler, H., Stiegler, G., Ferko, B., Vecera, B., & Katinger, H. (2006). GMP production of liposomes a new industrial approach. *Journal of liposome research*, 16(3), 311-319. <https://doi.org/10.1080/08982100600851086>.
- Wedlock, D. N., Denis, M., Skinner, M. A., Koach, J., De Lisle, G. W., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., van Drunen Littel-van den Hurk, S., & Buddle, B. M. (2005). Vaccination of cattle with a CpG oligodeoxynucleotide-formulated mycobacterial protein vaccine and *Mycobacterium bovis* BCG induces levels of protection against bovine tuberculosis superior to those induced by vaccination with BCG alone. *Infection and immunity*, 73(6), 3540-3546. <https://doi.org/10.1128/iai.73.6.3540-3546.2005>.
- Weisman, S., Hirsch-Lerner, D., Barenholz, Y., & Talmon, Y. (2004). Nanostructure of cationic lipid-oligonucleotide complexes. *Biophysical journal*, 87(1), 609-614. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.033480>.

- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The veterinary journal*, 192(2), 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>.
- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2021). Invited review: The role of the blood–milk barrier and its manipulation for the efficacy of the mammary immune response and milk production. *Journal of dairy science*, 104(6), 6376-6388. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20029>.
- Yang, S., Chen, J., Zhao, D., Han, D., & Chen, X. (2012). Comparative study on preparative methods of DC-Chol/DOPE liposomes and formulation optimization by determining encapsulation efficiency. *International journal of pharmaceutics*, 434(1-2), 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.041>.
- Yao, Y., Zhang, Z., & Yang, Z. (2023). The combination of vaccines and adjuvants to prevent the occurrence of high incidence of infectious diseases in bovine. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1243835. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1243835>.
- Yebra, G., Harling-Lee, J. D., Lycett, S., Aarestrup, F. M., Larsen, G., Cavaco, L. M., Guardabassi, L., Granquist, E. G., Jørgensen, H. J., Stegger, M., Sieber, R. N., Richards, V., Zadoks, R. N., Holmes, M. A., & Fitzgerald, J. R. (2022). Multiclonal human origin and global expansion of an endemic bacterial pathogen of livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(50), e2211217119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2211217119>.
- Zaatout, N., Ayachi, A., & Kecha, M. (2020). *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. *Journal of applied microbiology*, 129(5), 1102-1119. <https://doi.org/10.1111/jam.14706>.
- Zachova, K., Krupka, M., & Raska, M. (2016). Antigen cross-presentation and heat shock protein-based vaccines. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 64(1), 1-18.
- Zadoks, R., Allore, N., Barkema, H.G., Sampimon, H.W., Wellenberg, O.C. et al. (2001) Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 84, 2649–2663. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0370-x>.
- Zecconi, A., Calvino, L., & Fox, L. (2006). *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin-International Dairy Federation*, (408), 1-37.
- Zecconi, A., Hamanno, J., Bronzo, V., Moroni, P., Giovannini, G., & Piccinini, R. (2002). Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Biology of the Mammary Gland*, 287-293. https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_33.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., & Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial pathogenesis*, 40(4), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2006.01.001>.
- Zhao, X., & Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of animal science*, 86 (suppl_13), 57-65. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0302>.

ANEXO I – Soluciones y medios de cultivo

Medio de cultivo

- Medio LB (Luria-Bertani): Triptona: 10 g/L; Extracto de levadura: 5 g/L; NaCl: 10 g/L; pH: 7.
- Medio LB-Agar: Medio LB + Agar-agar 20g/L.
- Medio SOC: Triptona: 20 g/L; Extracto de levadura: 5 g/L; NaCl: 0.5 g/L; KCl: 0.186 g/L; MgCl₂: 10 mM; MgSO₄: 10 mM; Glucosa: 20 mM
- Medio BHI (Infusión Cerebro Corazón): Infusión de cerebro-corazón: 1,5 g/L Peptona: 10 g/L; Dextrosa: 2 g/L; NaCl: 5 g/L; Fosfato disódico (Na₂HPO₄) 2.5 g/L.
- Agar Base Peptona Peptona, 5 g/L; tripteína, 10 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; extracto de corazón, 3 g/L; almidón, 1 g/L; NaCl, 5 g/L; agar-agar, 15 g/L.
- Agar Sangre: Agar Base suplementado con Sangre bovina 5 % (v/v)

Soluciones generales

- PBS: NaCl: 137 mM; KCl: 2.7 mM; Na₂HPO₄; KH₂PO₄; pH 7.2
- PBS-Tween PBS: PBS suplementado con Tween-20 (Sigma) 0,05 % (v/v)
- Solución de bloqueo: Leche de cabra descremada 5% (p/v PBS)
- Buffer acetato: Acetato de sodio 50mM; pH: 4,3
- Buffer Carbonato: (Na₂CO₃): 15 mM; (NaHCO₃): 35 mM; pH: 9,6.

Purificación de proteínas en columna de pseudoafinidad a Niquel

- Buffer A: Tris: 50mM; NaCl: 500mM; Imidazol: 25mM; pH: 8,0.
- SE1: Buffer A; Imidazol: 50mM
- SE2 Buffer A; Imidazol: 250mM
- SE3 Buffer A; Imidazol: 500 mM

Electroforesis en geles de agarosa

- Buffer de muestra: Azul de bromofenol: 2,5 mg/mL; Glicerol: 300 mL/L
- TAE: Tris acetato: 40 mM; EDTA: 1mM

Electroforesis en geles de poliacrilamida

- Gel de apilamiento: Tris-HCl 130 mM (pH 6,8), SDS 0,05 % (p/v), acrilamida/bisacrilamida (29:1) 4,8 % (p/v), TEMED 0,1 % (v/v) y persulfato de amonio 0,05 % (p/v).
- Gel de corrida: Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,01 % (p/v), acrilamida/bisacrilamida (29:1) 12 % (p/v), Glicerol 10%; TEMED 0,6 % (v/v) y persulfato de amonio 0,05 % (p/v).
- Buffer de muestra 4X: Tris-HCl 250 mM (pH 6,8); Glicerol: 40%; SDS 8% (p/v); β-mercaptoetanol 10%; Azul de bromofenol 0.4%.
- Buffer de corrida: Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), Glicina: 192 mM; SDS 0.1%(p/v),

Actividad hemolítica

- Solución diluyente de GR: PBS; Mg(SO)₄: 2 mM; Albumina sérica bovina 0.1%

Tinción de Gram

- Cristal violeta: 1 % (p/v)
- Lugol: Yodo cristal: 1 % (p/v); Yoduro de potasio: 2 % (p/v)
- Decolorante: Alcohol etílico 96 % / Acetona: 66,6 % / 33,3 % (v/v)
- Safranina: 1 % (p/v)

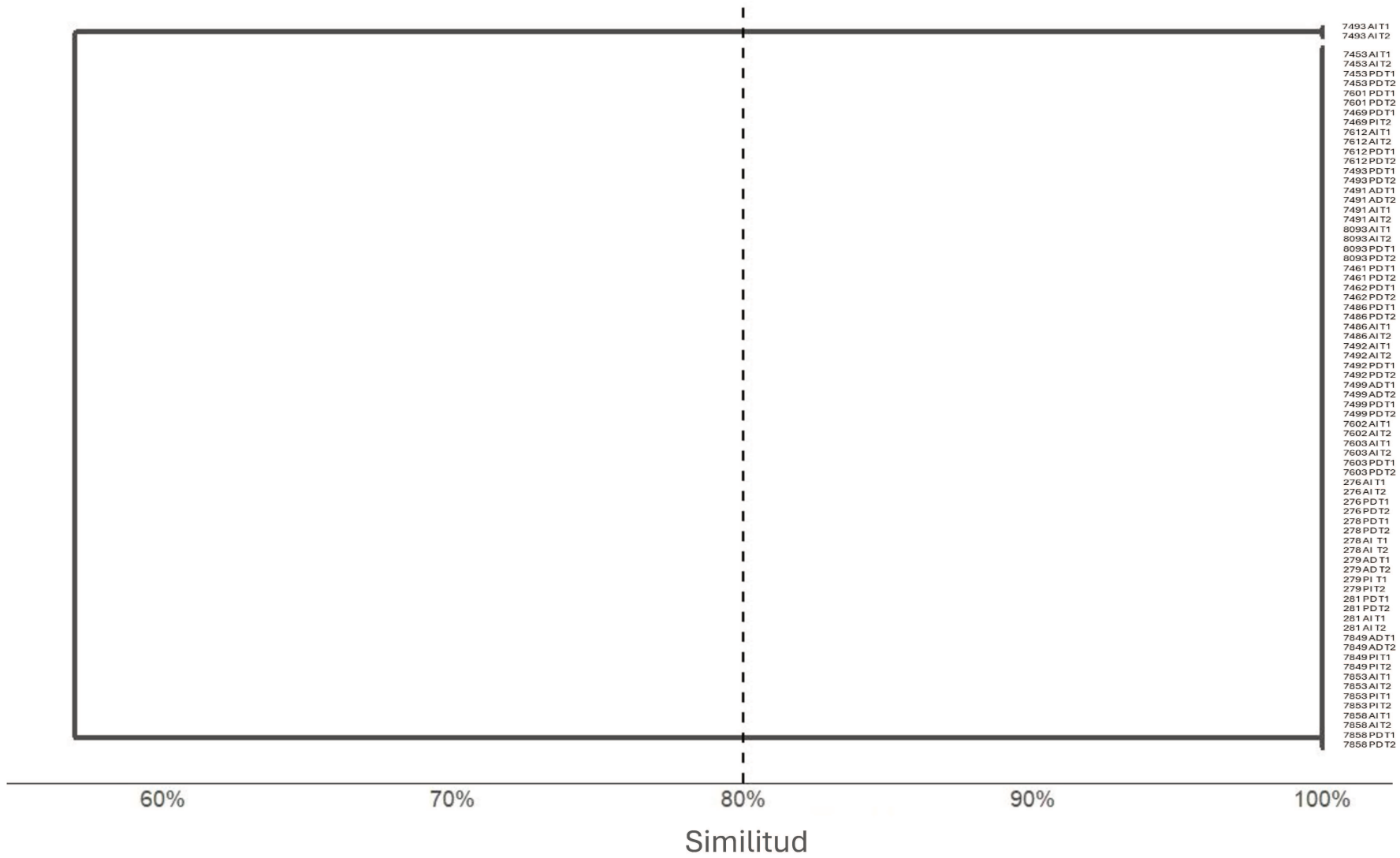
Transformación de bacterias por técnica MOPS/CaCl₂

- Solución de transformación (ST1): Buffer MOPS: 10 mM; KCl: 10 mM; pH: 7,0
- ST2: Buffer MOPS: 100 mM; KCl: 10 mM; CaCl₂: 50 mM; pH: 6,5

Citometría

- FACS: PBS 1×; BSA: 1% (p/v); Azida Sodica: 0.01% (p/v); pH 7,2.

ANEXO II – Análisis PFGE



ANEXO III: Optimización de la expresión de rFnbpA de S. aureus

Esta actividad se realizó en el marco de una pasantía en la Unidad de Ingeniería de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo, a través de una beca otorgada por el Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU-BIOLAC), durante 2025.

Objetivo del entrenamiento:

Optimizar la expresión de la proteína recombinante FnpA mediante Ingeniería de Proteínas *in silico* y evaluar diferentes condiciones de expresión en *E. coli*.

Antecedentes:

El dominio A de las proteínas de unión a fibronectina (Fn) de *S. aureus*, FnbpA y FnbpB, desempeña un papel clave en las interacciones bacteria-hospedador. Este dominio se localiza en el extremo N-terminal de ambas proteínas y se subdivide en tres subdominios: N1, N2 y N3. Los subdominios N2 y N3 son esenciales para la formación del sitio de unión al fibrinógeno, mientras que la región adyacente de repeticiones de unión a fibronectina (FnBRs) facilita la adhesión fibronectina (Stemberk et al., 2014).

Inicialmente, para la formulación vacunal evaluada en los capítulos 1 y 2 de este trabajo, se utilizó un péptido comprendido por una secuencia representativa de FnBRs (Fibronectin-Binding Repeats) las cuales son secuencias repetitivas de unión a Fn presentes en FnbpA de *S. aureus* que poseen alta afinidad de unión a este ligando. Las FnBRs se consideran regiones intrínsecamente desordenadas, por lo que no tienen una estructura definida antes de unirse a Fn y una vez que se unen adquieren una estructura ordenada en forma de lámina β . (Bingham et al., 2008). Se ha reportado que las respuestas inmunes más dominantes contra las FnBRs reconocen principalmente neo epítopes conformacionales que se generan cuando las regiones FnBRs están complejadas con Fn, más que el antígeno en estado libre (Foster et al., 2016). Además, se ha observado que los anticuerpos que reconocen la región de unión a Fn a menudo no inhiben la unión bacteriana a este ligando e incluso pueden ver potenciada su unión en presencia de Fn (Edwards et al., 2010).

Ante estas limitaciones, el enfoque para el rediseño de este antígeno se desplazó hacia la región N-terminal de la FnbpA, específicamente hacia los dominios N2 y N3. A diferencia de las FnBRs, que son intrínsecamente desordenadas, los subdominios N2 y N3 adoptan un plegamiento de tipo inmunoglobulina lo que les otorga una estructura secundaria y terciaria definida y potencialmente, una mayor estabilidad intrínseca (Loughman et al., 2008; Stemberk et al., 2014). Esta región es multifuncional, siendo la responsable de la unión al fibrinógeno y a la elastina mediante un mecanismo dinámico conocido como "*dock, lock, and latch*" (DLL) (Ponnuraj et al., 2003).

En este contexto, se planteó como hipótesis que la obtención de una proteína recombinante que abarque estos dominios mejoraría la estabilidad estructural del inmunógeno y permitiría generar anticuerpos capaces de bloquear sitios críticos de interacción con el hospedador.

Descripción de las actividades realizadas

Durante la pasantía se llevaron a cabo actividades centradas en la optimización de la expresión y caracterización de variantes alternativas de FnbpA. El trabajo se estructuró en tres etapas principales. En primer lugar, se empleó un flujo de trabajo de diseño proteico *in silico*, integrando algoritmos de inteligencia artificial de última generación como AlphaFold2 y ProteinMPNN. Este enfoque permitió la generación de variantes optimizadas de FnbpA, las cuales fueron evaluadas estructural y funcionalmente. En segundo lugar, las secuencias diseñadas se clonaron en vectores de expresión desarrollados por la unidad anfitriona, que incluyeron etiquetas de purificación HisTag y StreptagII. Se evaluaron diversas condiciones de expresión en cultivos de *E. coli* a pequeña y gran escala, con el objetivo de maximizar el rendimiento de proteínas solubles y correctamente plegadas. Finalmente, las proteínas expresadas se purificaron mediante técnicas cromatográficas utilizando el sistema ÄKTA Pure. Se caracterizaron sus propiedades biofísicas, incluyendo el estado oligomérico mediante cromatografía de exclusión molecular analítica y la estabilidad térmica y química mediante nano-calorimetría diferencial de barrido por fluorimetría (nano-DSF; Prometheus, NanoTemper).

Metodología y Resultados.

Estudio de secuencias y diseño de constructos

Se estudiaron secuencias de FnbpA provenientes de distintas cepas de *S. aureus*, con el fin de evaluar diferencias estructurales, bioquímicas y funcionales en los dominios N-terminales involucrados en la unión al fibrinógeno. Esto incluyó cepas humanas (referencia: NCTC 8325 / PS 47, UniProt: P14738), cepas bovinas (referencia: RF122 / ET3-1, UniProt: Q2YW62) y la secuencia de FnbpA de la cepa Reynolds, previamente estudiada por nuestro grupo (referencia: FnbpA ARG, GenBank: KJ001293 – UniProt: X2EXF7).

El alineamiento de secuencias y los análisis comparativos revelaron una fuerte conservación estructural, particularmente en el sitio de unión al fibrinógeno. La estructura representativa de los subdominios N2 y N3 de la proteína FnbpA, en complejo con el péptido de unión al fibrinógeno (resaltado en amarillo), se presenta en la Figura 1. El mapeo de conservación sobre el modelo estructural revela que ambos subdominios poseen un núcleo altamente conservado (en rojo), lo que garantiza que un antígeno recombinante diseñado sobre esta estructura sea representativo de diversas cepas de *S. aureus*.

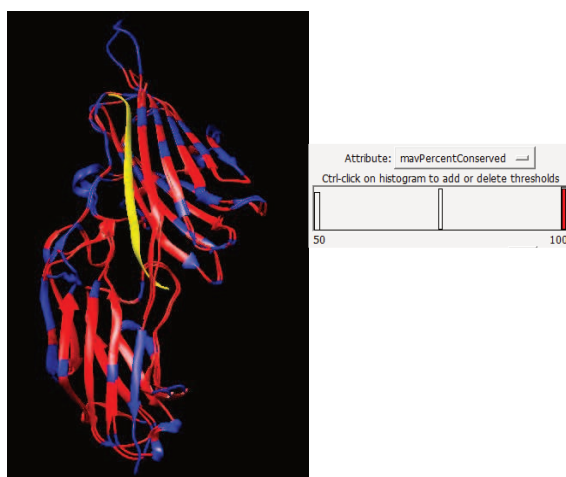


Figura 1. Representación estructural de los subdominios N2 y N3 de la proteína *FnbpA* en complejo con el péptido de fibrinógeno (resaltado en amarillo). La estructura está mapeada según su grado de conservación evolutiva: el rojo indica una conservación del 100%, mientras que el azul señala regiones de menor conservación (aproximadamente 50%). Se observa que el sitio de unión al ligando se localiza en una región altamente conservada, lo que sugiere su relevancia funcional y su potencial como antígeno.

Con base en estos hallazgos, se diseñaron dos constructos para su evaluación: uno que comprende los subdominios N2N3 (residuos 194–512) y otro que consiste únicamente en el dominio N3 (residuos 337–503) de la proteína *FnbpA* de *S. aureus*. Ambos diseños mostraron altos niveles de confianza en las estructuras predichas por AlphaFold2, reflejados en sus puntajes de pLDDT (predicted Local Distance Difference Test). El pLDDT es una métrica de confianza por residuo que utiliza AlphaFold2 para predecir qué tan bien se ajusta la estructura local al modelo real. El constructo *FnbpA*-N2N3 obtuvo un pLDDT promedio de 92,7, mientras que *FnbpA*-N3 alcanzó un 91,1. Estos valores, al situarse por encima de 90, indican una precisión de confianza muy alta en la predicción de la estructura a nivel de coordenadas de cadena lateral, lo que valida la estabilidad teórica de los antígenos diseñados.

Síntesis y clonado molecular

Las secuencias diseñadas fueron sintetizadas y clonadas comercialmente (GenScript, USA Inc.) en vectores de expresión previamente desarrollados por la Unidad de Ingeniería de Proteínas (Correa et al., 2014; Ortega et al., 2018). Como se observa en el esquema de los vectores (Figura 2), se obtuvieron dos constructos (*rFnbpA*-N2N3T7 y *rFnbpA*-N3T7) diseñados para la expresión citoplasmática en *E. coli* bajo el control del promotor T7.

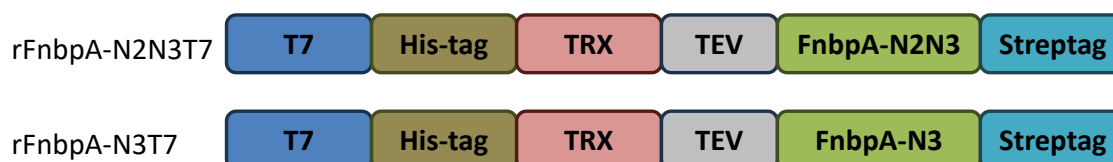


Figura 2: Representación esquemática de los casetes de expresión para los antígenos recombinantes *rFnbpA-N2N3T7* y *rFnbpA-N3T7*. El diseño incluye un promotor T7, una etiqueta de poli-histidina (His-tag) en el extremo N-terminal seguida de una fusión con tioredoxina (TRX), un sitio de corte para la proteasa TEV, el antígeno de interés (*FnbpA-N2N3* o *FnbpA-N3*) y una etiqueta Streptag en el extremo C-terminal.

La arquitectura de estos vectores incluye los siguientes elementos funcionales:

Purificación: Los constructos presentan un sistema de purificación dual. En el extremo N-terminal se localiza una etiqueta de poli-histidina (His-tag), y en el extremo C-terminal una etiqueta de Streptag, lo que permite protocolos de purificación por afinidad de alta pureza.

Solubilidad: A su vez ambos antígenos se expresan como proteínas de fusión con TRX, incorporada para mejorar el plegamiento y la solubilidad de las proteínas recombinantes en el citoplasma bacteriano.

Sitio de corte proteolítico: Se incluyó un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV situado entre la fusión TRX y el antígeno de interés (*FnbpA-N2N3* o *FnbpA-N3*). Esto permite la eliminación de las etiquetas N-terminales (His-tag y TRX) tras la purificación inicial.

Los datos teóricos de tamaño esperado, de cada constructo luego de los diferentes pasos de purificación y eliminación de Tag se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Datos teóricos de tamaño esperado de las diferentes variantes de los constructos obtenidos.

Constructo	Peso Molecular (kDa)	Coefficiente de absorción (ml·mg⁻¹·cm⁻¹)
N2N3-TRX	50	1.07
N2N3-TRX-STREPTAG	51.6	1.15
N2N3	35.8	1.07
N2N3-STREPTAG	37.2	1.17
N3-TRX	33.5	1.3
N3-TRX-STREPTAG	34.8	1.4
N3	19	1.45
N3-STREPTAG	19.7	1.6

Expresión de proteínas recombinantes en E. coli

Ambos constructos fueron transformados en células de *E. coli* BL21(DE3) *pLysS* mediante transformación química por choque térmico. Para este procedimiento, se empleó 1.5 ul de cada constructo (plásmido) sobre alícuotas de células competentes que se mantenían conservadas a -80°C.

Tras un periodo de incubación en hielo por 2 minutos, seguido de un choque térmico de 45 segundos a 42 °C, las células se recuperaron en medio líquido LB y se incubaron ON a 37 °C bajo selección con ampicilina. Este cultivo se utilizó directamente como inóculo para la posterior inducción y análisis de la expresión proteica.

Para la expresión proteica, las bacterias transformadas se cultivaron en 800 mL de medio 2YT (composición por litro: 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl) suplementado con ampicilina 1 mM a 37 °C, con agitación a 220 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ aproximada de 1.0, la expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de 0,5 mM de IPTG, seguida de una incubación ON a 20 °C con agitación. Al día siguiente, las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 0.3 M NaCl, 1 mM PMSF y 0.5 mg/mL de lisozima) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

Purificación de proteínas

La purificación de las proteínas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando un sistema ÄKTA™ pure (Cytiva). Las células de *E. coli* obtenidas en el punto anterior se descongelaron, se lisaron por sonicación y se procesaron con un Emulsiflex. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.2 µm, para luego cargarse en una columna de cromatografía de afinidad a níquel de 1 mL (IMAC; HiTrap HP, Cytiva) previamente equilibrada con el buffer A (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM imidazol). La elución se realizó utilizando el buffer B (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol). A esta primera ronda de purificación se la denominó IMAC 1. Se conservaron en este paso muestras para SDS-PAGE.

Las proteínas purificadas se dializaron durante la noche a 4 °C contra el buffer de diálisis (500 mM NaCl + 25 mM Tris) en presencia de proteasa TEV (1 mg por cada 10 mg de proteína diana). Se realizó una segunda ronda de purificación por IMAC (IMAC 2) utilizando la muestra dializada. Las proteínas diana (N2N3 o N3) clivadas, fusionada a streptag, se recuperaron en la fracción no unida, mientras que la proteasa TEV usada para el clivado o el fragmento Histag-TRX, según correspondiera, se recuperaron durante la elución con 100 % de buffer B. Todas las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 3) y se cuantificaron por absorbancia a 280 nm.

Para ambos constructos, luego del proceso mencionado se produjeron proteínas solubles en las siguientes cantidades: N2N3: 1.17 mg/mL (total 10.25 mg); N3: 1.6 mg/mL (total 22.5 mg).

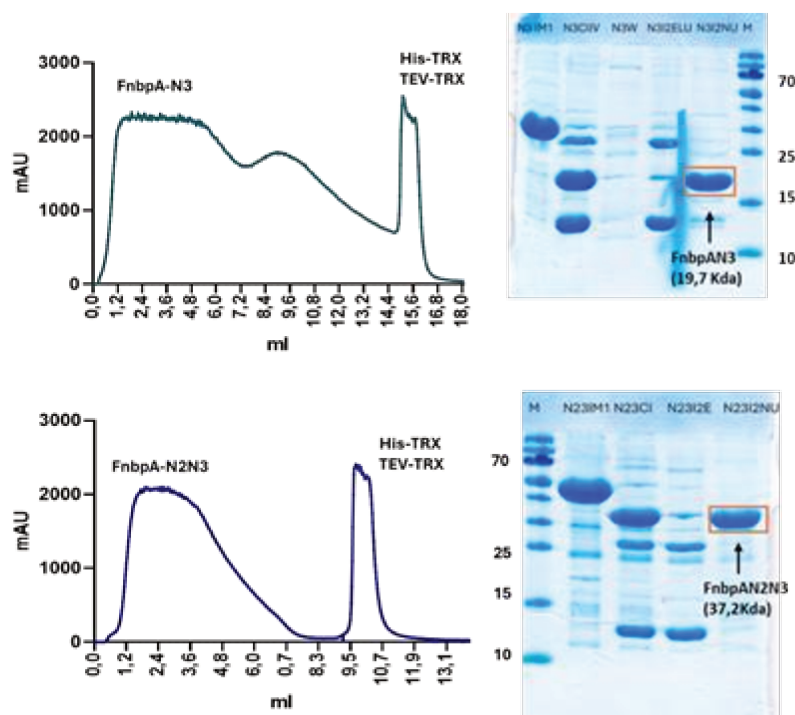


Figura 3. Purificación por IMAC de las proteínas N2N3-TRX y N3-TRX utilizando una columna HiTrap HP de 1 mL (Cytiva). Las fracciones purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE al 15 % para evaluar la pureza proteica. Etiquetas de las muestras: gel 1: N3IM1 – elución de IMAC 1 de FnBPA N3; N3CLIV – FnBPA N3 clivada; N3W – fracción de lavado; N3I2ELU – elución de IMAC 2 de FnBPA N3; N3I2NU – fracción no unida de IMAC 2 de FnBPA N3; gel 2: M – marcador de peso molecular; N23IM1 – elución de IMAC 1 de FnBPA N2N3; N23CL – FnBPA N2N3 clivada; N23I2E – elución de IMAC 2 de FnBPA N2N3; N23I2NU – fracción no unida de IMAC 2 de FnBPA N2N3.

Purificación mediante Strep-tag II y verificación por SDS-PAGE

Las proteínas recombinantes FnBPA N2N3 y FnBPA N3 obtenidas en la sección previa, fusionadas a una etiqueta Strep-tag II, se sometieron a una nueva ronda de purificación por cromatografía de afinidad, esta vez utilizando una columna Strep-Tactin® XT Superflow (IBA Lifesciences). El objetivo principal de este paso de purificación fue eliminar contaminantes derivados del lisado celular y obtener una preparación limpia para los análisis biofísicos posteriores. El proceso inició con el equilibrio de la columna en Buffer W (100mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8), seguido de la carga de la muestra (N2N3-Strep-tag II y N3-Strep-tag II, obtenidas de la IMAC 2). Tras realizar lavados exhaustivos para eliminar contaminantes remanentes, la elución de las proteínas diana se efectuó mediante la adición de D-biotina 50 mM, la cual al poseer una afinidad mayor por la matriz Strep-Tactin® XT produce un desplazamiento competitivo específico

La eficacia del procedimiento se confirmó mediante SDS-PAGE (Figura 4), donde se observó una banda predominante correspondiente a la proteína esperada en las fracciones eluidas (N23ELU y N3ELU), junto con la presencia de proteínas inespecíficas en las fracciones no unidas (NU). Esta

resina de alta especificidad permitió una recuperación eficiente de las proteínas bajo condiciones suaves, preservando su conformación nativa.

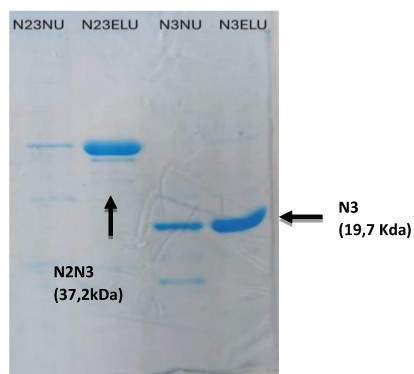


Figura 4. Las fracciones eluidas N23ELU y N3ELU se obtuvieron mediante purificación con Strep-Tactin® XT Superflow utilizando 50 mM de biotina para la elución. La presencia y pureza de las proteínas recombinantes se evaluaron mediante SDS-PAGE al 15 %, Etiquetas de las muestras: N23NU – fracción no unida de FnBPA N2N3; N23ELU – fracción eluida de FnBPA N2N3; N3NU – fracción no unida de FnBPA N3; N3ELU – fracción eluida de FnBPA N3.

Producción de FnBPA-N3 utilizando medio enriquecido

Además, se evaluó la expresión de la proteína FnBPA-N3 utilizando un medio de cultivo Terrific Broth (TB; Triptona 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, glicerol 0.4 % v/v, KH₂PO₄ 17 mM, K₂HPO₄ 72 mM, pH 7.2), un medio rico en nutrientes formulado para alcanzar una alta densidad celular bacteriana. Partiendo de un volumen de cultivo similar al utilizado con medio 2YT (800 ml) y aplicando el mismo protocolo de purificación que el mencionado para IMAC 1 y 2, el rendimiento proteico se incrementó aproximadamente en tres órdenes de magnitud, alcanzando un nivel de producción total de 58.43 mg (Figura 5).

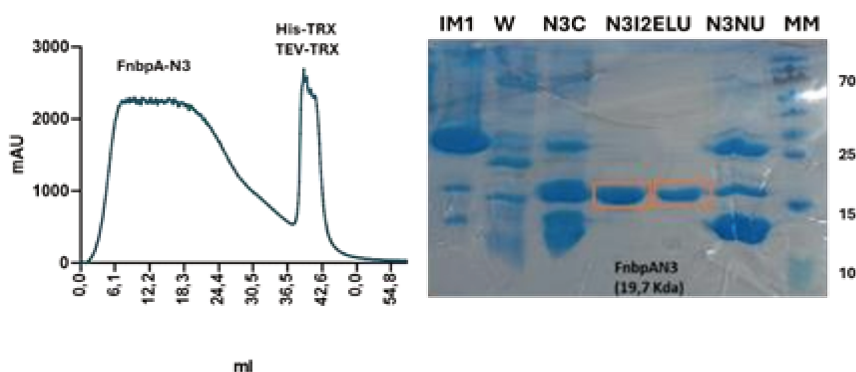


Figura 5. Purificación por IMAC1 y 2 de la proteína N3-TRX utilizando una columna HiTrap HP de 5 mL (Cytiva). Las fracciones purificadas se cargaron en un gel SDS-PAGE al 15 % para su visualización y evaluación de la pureza proteica. IM1 – elución de IMAC 1; W – fracción de lavado; N3C – N3 clivada; N3I2ELU – elución de IMAC 2 de FnBPA N3; N3NU – fracción no unida de IMAC 2 de FnBPA N3; M – marcador de peso molecular.

Caracterización biofísica

Para la caracterización biofísica, el estado oligomérico de las proteínas se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un sistema ÄKTA™ pure. Se empleó una columna Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare/Cytiva), la cual fue previamente equilibrada con una solución buffer de 25mM Tris/150mM NaCl. Para el ensayo, se inyectó un volumen de 500 μ L de la muestra obtenida de la última purificación por afinidad (IMAC/Strep-Tactin). La corrida se realizó con un volumen final de 25 mL a un flujo constante, monitoreando la absorbancia a 280 nm (Figura 6). Ambas proteínas presentaron un comportamiento predominantemente monomérico y una alta homogeneidad estructural. Los perfiles de elución revelaron picos únicos y simétricos con volúmenes de elución de 16.8 mL para N2N3 y 17.9 mL para N3, respectivamente. La diferencia en los volúmenes de elución es consistente con el mayor peso molecular esperado para el constructo en tándem (N2N3) frente al dominio individual (N3). La ausencia de picos significativos en el volumen de exclusión (\sim 8 mL) confirma que las preparaciones están libres de agregados de alto peso molecular

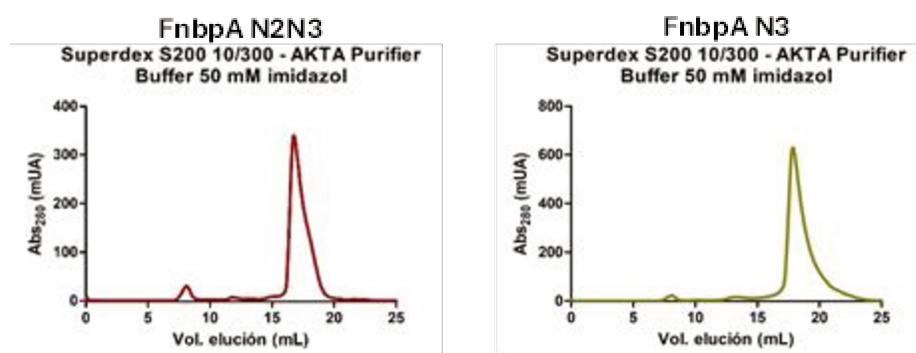


Figura 6. Perfiles de exclusión por tamaños de los dominios FnbpA obtenidos utilizando una columna Superdex 200 10/300 en un sistema ÄKTA Purifier.

Caracterización por dispersión dinámica de la luz (DLS)

Para determinar el tamaño hidrodinámico y el estado de agregación de las proteínas purificadas, se realizaron medidas de DLS utilizando un equipo Zetasizer Nano (Malvern Panalytical). Previo a la medición, las muestras de rFnbpA-N2N3 y rFnbpA-N3 se clarificaron mediante centrifugación a 20,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para eliminar posibles agregados de gran tamaño o partículas de polvo. Posteriormente, se transfirieron 25 μ L de cada muestra a micro-cubetas desechables de 40 μ L, configurando el sistema para un equilibrado térmico a 23 °C. El protocolo de adquisición consistió en 5 corridas consecutivas por muestra con un tiempo total de 300 segundos para obtener el diámetro hidrodinámico promedio y el índice de polidispersidad (PDI).

Los resultados obtenidos (Tabla 2, Figura 7) para el subdominio N3 indican una muestra moderadamente monodispersa, con un PDI de 0.296, un valor que se encuentra dentro del rango

aceptable para proteínas bien definidas en solución. El diámetro hidrodinámico de 8.32 nm sugiere una proteína correctamente plegada y homogénea, sin agregación significativa, lo que indica que una única especie conformacional predomina en la muestra. En contraste, la medición correspondiente al dominio N2N3 arrojó un diámetro hidrodinámico de 5.91 nm, inesperadamente menor a la del del subdominio N3. Esta observación no concuerda con la arquitectura estructural esperada de una proteína compuesta por dos dominios globulares, lo que sugiere que la medición no refleja con precisión el estado real de la muestra. La alta polidispersidad (PDI 0.980) y la inconsistencia en el diámetro hidrodinámico observado para N2N3 pueden atribuirse a la flexibilidad intrínseca del enlazador entre los subdominios. Según lo reportado por Schwarz-Linek et al., (2003), este tipo de arquitectura modular posee una variabilidad inherente en su orientación intermodular. Esta falta de rigidez estructural y la consecuente diversidad conformacional en solución podrían generar una señal de dispersión heterogénea que interfiere con el modelo de esfera rígida asumido por el análisis de DLS.

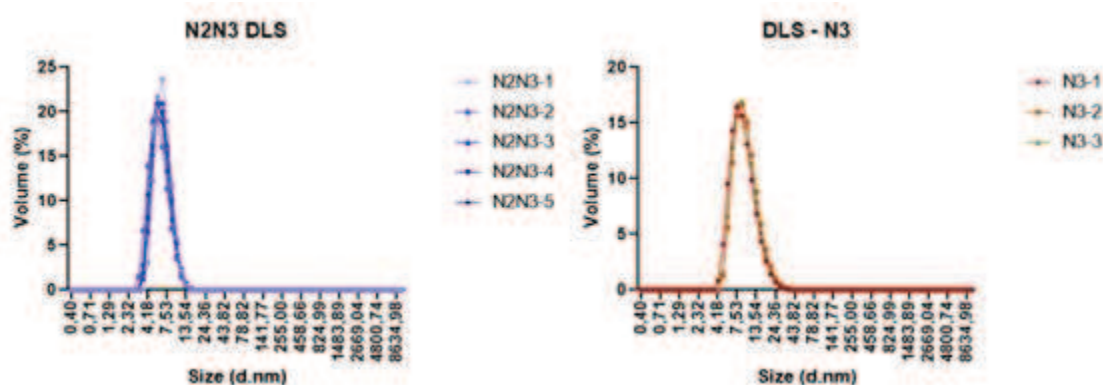


Figura 7: Análisis de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Distribución del tamaño hidrodinámico de los dominios N2N3 (izquierda) y N3 (derecha), representada como porcentaje de volumen frente al diámetro (d.nm)

Tabla 2: Valores obtenidos de DLS

Proteína	Tamaño (d.nm)	DESV	IPD
N2N3	5,91	0,51	0,901
N2	8,32	0,69	0,296

Perfiles de desnaturalización térmica de las proteínas recombinantes N2N3 y N3.

La estabilidad térmica y el perfil de desplegamiento de las proteínas rFnbpA-N2N3 y rFnbpA-N3 se evaluaron mediante fluorimetría diferencial de escaneo (nanoDSF) en un instrumento Prometheus

NT.48 (NanoTemper Technologies). Este método permite monitorear el estado de plegamiento de las proteínas midiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano y tirosina. Se cargaron aproximadamente 10 μL de cada proteína purificada en capilares de alta sensibilidad (High Sensitivity Capillaries, NanoTemper). Las proteínas se analizaron a una concentración final de 0.5 mg/mL en Buffer NaCl 150 mM. Las muestras se sometieron a un incremento de temperatura controlado desde 20 $^{\circ}\text{C}$ hasta 95 $^{\circ}\text{C}$, con una rampa de calentamiento de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La Figura 8 muestra los perfiles de desnaturalización térmica de diferentes variantes de las proteínas N2N3 y N3, monitoreados mediante fluorescencia intrínseca bajo un gradiente de temperatura controlado. Las curvas representan la primera derivada de la señal de fluorescencia, lo que permite una determinación precisa de los puntos medios de transición térmica, que reflejan la estabilidad estructural de cada variante. Se observaron picos de transición bien definidos para las proteínas obtenidas luego de la cromatografía de exclusión (N2N3GF, línea azul continua y N3GF, línea naranja continua), con valores de T_m de 42.7 $^{\circ}\text{C}$ y 48.5 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Estos resultados indican que ambas formas proteicas presentan una estabilidad térmica moderada y una conformación bien estructurada en solución. La naturaleza definida de las transiciones sugiere que el proceso de desnaturalización ocurre de manera cooperativa, característica de especies proteicas estructuralmente homogéneas.

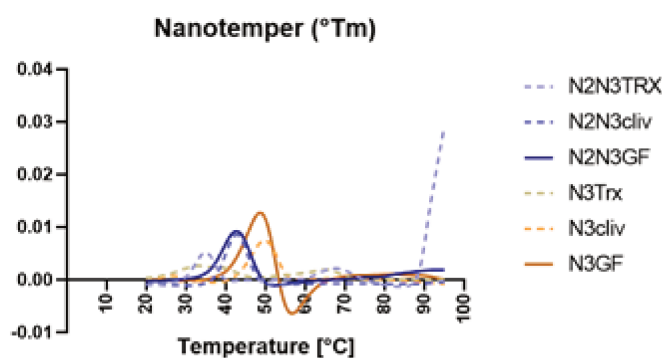


Figura 8. Estabilidad térmica de las variantes proteicas determinada mediante el sistema NanoTemper Prometheus. Curvas de la primera derivada de la fluorescencia intrínseca que indican los puntos medios de transición térmica para las diferentes variantes de N2N3 y N3.

Además, en relación con la caracterización de la estabilidad térmica, la temperatura de fusión (T_m) de ambas variantes se determinó bajo un amplio rango de condiciones. Las proteínas rFnbpA-N2N3 y rFnbpA-N3 se concentraron inicialmente por centrifugación y se diluyeron a una concentración final de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en diferentes buffers de ensayo. Las condiciones evaluadas incluyeron variaciones en la fuerza iónica (NaCl 150 mM, 300 mM, 500 mM y 1 M), la adición de agentes desnaturalizantes (SDS al 0,1% y 0,5%), agentes reductores (DTT 1 mM), sales (MgSO_4 0,5 mM) y crioprotectores (5% de glicerol), además de comparar el efecto de las temperaturas de almacenamiento a -20°C y -80°C . A partir de estos análisis, es destacable que la adición de 5% de glicerol resultó ser la condición más favorable para la estabilidad de las muestras, superando el

desempeño de los demás aditivos y buffers evaluados. Bajo esta condición, se alcanzaron valores de T_m de 45,3 °C para N2N3 y 50,5 °C para N3. Por otro lado, los resultados confirman que el subdominio N3 presenta una estabilidad térmica intrínseca superior a la del constructo N2N3, manteniendo una diferencia de aproximadamente 5 °C a favor de la variante de dominio único en la mayoría de las condiciones probadas.

Diseño de variantes mutantes

El objetivo de esta sección fue generar variantes con mayor termoestabilidad, manteniendo al mismo tiempo la estructura global. Para ello, se utilizó ProteinMPNN como una red neuronal profunda basada en el paso de mensajes sobre grafos, diseñada para predecir secuencias de aminoácidos que puedan adoptar, de manera estable, una estructura tridimensional dada. Esta herramienta ha demostrado ser eficaz para mejorar propiedades proteicas como la estabilidad y la expresión, mediante la generación de secuencias que son estructuralmente compatibles con esqueletos proteicos nativos o diseñados. En este caso aplicamos ProteinMPNN para el rediseño del dominio N3 de la proteína FnbpA de *Staphylococcus aureus*. Para ello, se seleccionaron posiciones específicas dentro del dominio N3 de FnbpA, consideradas susceptibles de modificación, sin comprometer la estructura ni la función. Estas posiciones se utilizaron como entrada para el modelo, permitiendo que la red neuronal propusiera nuevas secuencias optimizadas exclusivamente en esos sitios. Como resultado, ProteinMPNN generó variantes con sustituciones en los residuos seleccionados, orientadas a mejorar la estabilidad estructural de la proteína. Posteriormente, se utilizó ThermoMPNN para estimar el impacto energético de cada mutación propuesta.

Los residuos originales y las sustituciones sugeridas por el modelo se detallan a continuación

Posición	Aminoácido Original	Aminoácido propuesto (FnbpA N3 CON)	Aminoácido propuesto (FnbpA INT)	Aminoácido propuesto (FnbpA DIF)
187	Ile (I)	Val (V)	Val (V)	Val (V)
173	Tyr (Y)	Phe (F)	Phe (F)	Phe (F)
209	Val (V)	Tyr (Y)	Tyr (Y)	Tyr (Y)
229	Met (M)	Lys (K)	Lys (K)	Lys (K)
171	Val (V)	-	Ile (I)	Thr (T)
224	Ile (I)			Leu (L)
259	Ser (S)			Ala (A)

Estas sustituciones se seleccionaron en función de su potencial para aumentar la termoestabilidad, lo cual fue posteriormente confirmado mediante el análisis con ThermoMPNN, que demostró una

reducción significativa de la energía para las variantes propuestas. Se generaron tres nuevos constructos: uno que incorpora cambios más conservadores (FnbpA CON), otro con modificaciones intermedias (FnbpA INT) y un tercero con alteraciones más extensas (FnbpA DIF). Todos los constructos fueron sintetizados comercialmente en los mismos vectores utilizado anteriormente (GenScript, USA Inc.) (Correa et al., 2014; Ortega et al., 2018).

Expresión y caracterización de las variantes

Los tres constructos fueron transformados en células de *E. coli* BL21 e inducidos en medio 2YT siguiendo el mismo protocolo descrito previamente. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando un sistema ÄKTA Purifier y columnas HiTrap HP de 1 mL (Cytiva). Las tres variantes de FnbpA N3 se expresaron exitosamente en forma soluble (Figura 9), obteniéndose cantidades similares a las obtenidas para la variante original (FnbpA N3 CON: 3,49 mg/mL (Total: 30,14 mg); FnbpA N3 INT: 2,8 mg/mL (Total: 16,87) y FnbpA N3 DIF: 3,46 mg/mL Total: 16,57 mg).

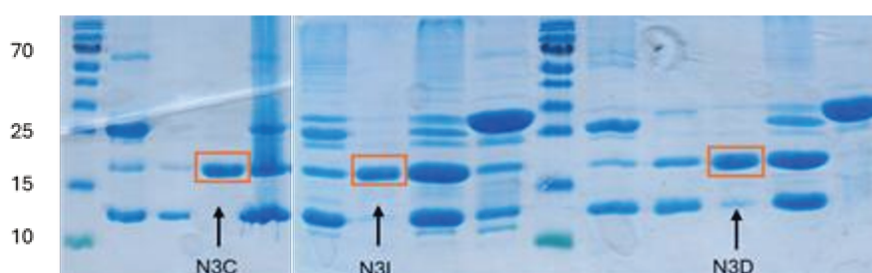


Figura 9. Purificación por IMAC de la proteína N3 y sus variantes mutantes utilizando una columna HiTrap HP de 5 mL (Cytiva). Las fracciones purificadas se cargaron en un gel SDS-PAGE al 15 % para su visualización y evaluación de la pureza proteica. IMI N3C: FnbpA N3-Conservada; N3I: FnbpA N3-Intermedia; N3D: FnbpA N3-Diferente.

La caracterización biofísica se realizó de manera similar a la mencionada previamente, utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (columna Superdex S200 10/300), confirmando que todas las proteínas se expresaron como especies monoméricas.

La estabilidad térmica de las proteínas se evaluó utilizando el sistema NanoTemper Prometheus, obteniéndose los siguientes valores de Tm: FnbpA N3 CON: 42,44 °C; FnbpA N3 INT: 43,66 °C; y FnbpA N3 DIF: 42,88 °C.

En cuanto a la caracterización de los mutantes generados, se confirmó que presentan un comportamiento similar al de la proteína original en términos de expresión soluble, estado monomérico y rendimiento. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, no se observó una mejora

en la estabilidad térmica en comparación con la proteína original; por el contrario, los resultados sugieren una posible disminución de la estabilidad.

Funcionalidad de las variantes generadas / capacidad de unión de las variantes generadas...

La capacidad de unión de las diferentes variantes de FnbpA generadas en este estudio se evaluó mediante ensayos tipo ELISA *in house*, utilizando fibrinógeno bovino (Fb). Las placas se recubrieron con 0,5 µg de fibrinógeno purificado de sangre bovina por pocillo en buffer Carbonato. Posteriormente se incubó con las proteínas recombinantes (N2N3, N3, N3CON, N3INT, N3DIF), todas portadoras de una etiqueta Strep, a una concentración de 5 µM en PBS Tween 20 (0,1%). Luego se incubó con un anticuerpo anti-Strep-tag conjugado a HRP (Strep-Tactin-HRP). Finalmente, la detección se realizó por la incubación con TMB y la detención de la reacción con H₂SO₄. La absorbancia se midió a 450 nm como indicador de la interacción proteína–fibrinógeno (Figura 10).

El dominio completo N2N3 mostró una señal significativamente mayor en comparación con las variantes que contienen únicamente el dominio N3 o sus mutantes, lo que indica una fuerte capacidad de unión al fibrinógeno. En contraste, el dominio N3 individual y sus variantes mutadas presentaron señales considerablemente menores, reflejando una afinidad reducida por el ligando. Entre las variantes de N3, se observaron ligeras diferencias en los niveles de unión, en particular para los mutantes N3 CON y N3 DIF, que mostraron una unión detectable pero reducida al Fb, lo que sugiere que ciertos residuos específicos podrían contribuir parcialmente a la interacción, aunque de manera limitada en ausencia del dominio N2.

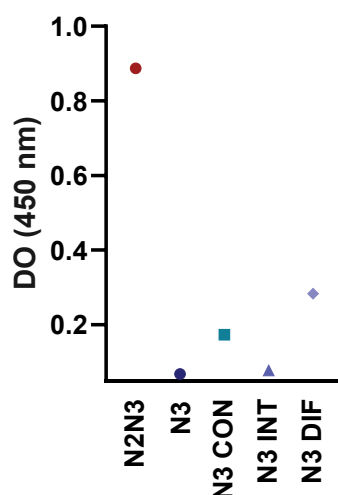


Figura 10. Unión del fibrinógeno bovino por variantes del dominio de unión a Fb de FnbpA de *Staphylococcus aureus*, evaluada mediante ELISA.

Conclusiones

En este trabajo, se logró con éxito la producción, purificación y caracterización biofísica de diferentes variantes de los dominios N3 y N2N3 de la proteína FnbpA de *Staphylococcus aureus*. Las proteínas recombinantes se expresaron eficientemente en *E. coli* de forma soluble, lo que permitió su purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC y Strep-Tactin), con rendimientos adecuados y niveles de pureza consistentes, según se confirmó por SDS-PAGE. Los estudios biofísicos mostraron que tanto el dominio N3 como el N2N3 se comportan como especies monoméricas en solución, exhibiendo el dominio N3 una mayor estabilidad térmica (T_m aprox. 48,5°C) que el N2N3 (aprox 42,7°C). El análisis por DLS reveló que el N3 adopta una conformación más homogénea y estable en comparación con el N2N3, el cual mostró heterogeneidad conformacional, probablemente debido a la flexibilidad interdominio. Se generaron variantes del dominio N3 diseñadas racionalmente mediante herramientas de aprendizaje profundo (ProteinMPNN y ThermoMPNN), con el objetivo de mejorar la termoestabilidad proteica. Aunque las variantes diseñadas (CON, INT y DIF) mantuvieron niveles de expresión adecuados y propiedades biofísicas comparables al N3 original, no resultaron en un aumento de la estabilidad térmica. Por el contrario, se observó una ligera reducción en la T_m , lo que sugiere que las mutaciones introducidas no fueron beneficiosas bajo las condiciones ensayadas. Finalmente, los ensayos funcionales de ELISA demostraron que el dominio completo N2N3 posee una afinidad significativamente mayor por el fibrinógeno bovino que el dominio N3 individual, reforzando el rol funcional cooperativo de ambos dominios en la unión al ligando. Las variantes mutadas de N3 conservaron parcialmente esta capacidad de unión, aunque en menor medida, posiblemente debido a la pérdida de residuos clave o a la ausencia del dominio N2. En conjunto, estos resultados demuestran que, si bien es factible diseñar y expresar variantes estructuralmente estables del dominio N3, mejorar su termoestabilidad y función mediante diseño racional sigue siendo un desafío. Podría ser necesaria una exploración más profunda del panorama mutacional, posiblemente mediante enfoques combinatorios, estrategias adicionales de estabilización estructural o evolución dirigida, para lograr mejoras significativas.