



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**RESPUESTA CLÍNICA E INMUNOLÓGICA FRENTE A UNA  
VACUNA EN BASE A PROTEOLIPOSOMAS BACTERIANOS EN UN  
MODELO MURINO DE MASTITIS POR *Escherichia coli***

**JOHN ANDRÉS QUIROGA ARDILES**

Tesis para optar al Grado de Magíster  
en Ciencias Animales y Veterinarias  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales

**PROFESOR GUÍA: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA**

PROYECTO FIA-PYT-2012-0055

**SANTIAGO, CHILE**  
**2018**

**MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS**

**RESPUESTA CLÍNICA E INMUNOLÓGICA FRENTE A UNA  
VACUNA EN BASE A PROTEOLIPOSOMAS BACTERIANOS EN UN  
MODELO MURINO DE MASTITIS POR *Escherichia coli***

**JOHN ANDRÉS QUIROGA ARDILES**

Tesis para optar al Grado de Magíster  
en Ciencias Animales y Veterinarias  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales

**COMITÉ ACADÉMICO**

	<b>Calificación</b>	<b>Firma</b>
<b>Leonardo Sáenz Iturriaga</b>	_____	_____
<b>Galia Ramírez Toloza</b>	_____	_____
<b>Sergio Bucarey Vivanco</b>	_____	_____

SANTIAGO, CHILE  
2018

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>3</b>
<b>A. MASTITIS BOVINA</b>	<b>3</b>
1. Definición general	3
2. Pérdidas económicas asociadas a mastitis	3
3. Epidemiología	4
4. Situación nacional	5
5. <i>Escherichia coli</i> como patógeno mastítico	5
6. Patogénesis	6
7. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria y respuesta inmune a la mastitis	7
<b>B. VACUNAS Y ADYUVANTES</b>	<b>9</b>
1. Antecedentes generales	9
2. Adyuvantes	9
3. Utilización de liposomas en formulaciones de vacunas	10
4. Desarrollo de vacunas contra la mastitis bovina	12
<b>C. MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE LA MASTITIS BOVINA</b>	<b>13</b>
1. Antecedentes generales	13
2. Consideraciones sobre el modelo murino	14
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>15</b>
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVO 1. Estimar la dosis mínima infectante para el establecimiento de un modelo experimental de mastitis clínica con una cepa de campo de <i>E. coli</i> en ratonas BALB/c.</b>	<b>16</b>
<b>1.1. MATERIAL Y MÉTODOS:</b>	<b>16</b>
1.1.1. <i>Animales</i>	16
1.1.2. <i>Cepa bacteriana</i>	16
1.1.3. <i>Preparación de inóculo bacteriano</i>	16
1.1.4. <i>Determinación de dosis mínima infectante para el establecimiento del modelo experimental</i>	17
1.1.5. <i>Normas de bioseguridad</i>	17
<b>1.2. RESULTADOS</b>	<b>18</b>
1.2.1. <i>Modelo experimental de mastitis clínica coliforme en ratonas lactantes</i>	18
1.2.2. <i>Determinación de la dosis mínima infectante para el modelo murino de mastitis clínica coliforme</i>	18

<b>OBJETIVO 2. Formular y caracterizar, mediante parámetros físico-químicos y moleculares, una vacuna en base a proteoliposomas obtenidos desde una cepa de campo de <i>E. coli</i>.</b>	<b>19</b>
<b>2.1. MATERIAL Y MÉTODOS:</b>	<b>19</b>
2.1.1. <i>Cepa bacteriana</i>	19
2.1.2. <i>Preparación de proteoliposomas bacterianos</i>	19
2.1.3. <i>Caracterización de proteoliposomas bacterianos</i>	20
2.1.4. <i>Análisis estadístico</i>	22
2.1.5. <i>Formulación de vacunas y placebos</i>	22
2.1.6. <i>Normas de bioseguridad</i>	22
<b>2.2. RESULTADOS:</b>	<b>23</b>
2.2.1. <i>Los proteoliposomas incorporaron moléculas bacterianas con rol inmunoestimulante</i>	23
2.2.2. <i>Caracterización física de proteoliposomas</i>	24
<b>OBJETIVO 3. Evaluar la respuesta inmune humoral tras la inmunización con una vacuna de proteoliposomas de <i>E. coli</i> en un modelo murino de mastitis clínica coliforme.</b>	<b>25</b>
<b>3.1. MATERIAL Y MÉTODOS:</b>	<b>25</b>
3.1.1. <i>Animales</i>	25
3.1.2. <i>Vacuna</i>	25
3.1.3. <i>Inóculo bacteriano</i>	25
3.1.4. <i>Diseño experimental</i>	25
3.1.5. <i>Análisis de seguridad</i>	25
3.1.6. <i>Extracción y procesamiento de glándulas mamarias</i>	26
3.1.7. <i>Extracción y procesamiento de muestras de sangre</i>	27
3.1.8. <i>Detección de anticuerpos específicos en sangre mediante ELISA indirecto</i>	27
3.1.9. <i>Detección de anticuerpos específicos en glándula mamaria mediante ELISA indirecto</i>	28
3.1.10. <i>Detección de anticuerpos totales en glándula mamaria mediante inmunohistoquímica</i>	28
3.1.11. <i>Análisis estadístico</i>	29
3.1.12. <i>Normas de bioseguridad</i>	29
<b>3.2. RESULTADOS:</b>	<b>30</b>
3.2.1. <i>La vacuna en base a proteoliposomas bacterianos fue segura en el modelo empleado</i>	30
3.2.2. <i>La vacuna en base a proteoliposomas de <i>E. coli</i> indujo un aumento en los niveles sanguíneos de anticuerpos específicos contra la bacteria</i>	30
3.2.3. <i>La vacuna en base a proteoliposomas bacterianos también indujo un aumento en los niveles de anticuerpos específicos en la glándula mamaria</i>	31
3.2.4. <i>La vacuna de proteoliposomas no modificó los niveles de anticuerpos totales a nivel mamario</i>	31
<b>OBJETIVO 4. Determinar la eficacia de una vacuna de proteoliposomas de <i>E. coli</i> sobre un modelo murino de mastitis clínica coliforme, mediante evaluación clínica, análisis bacteriológico y evaluación histopatológica de tejidos mamarios.</b>	<b>32</b>
<b>4.1. MATERIAL Y MÉTODOS:</b>	<b>32</b>
4.1.1. <i>Procesamiento de muestras</i>	32
4.1.2. <i>Bacteriología cualitativa</i>	32
4.1.3. <i>Bacteriología cuantitativa</i>	32
4.1.4. <i>Análisis histopatológico de tejidos mamarios</i>	32
4.1.5. <i>Evaluación clínica post desafío bacteriano</i>	33

4.1.6. Análisis estadístico	33
4.1.7. Normas de bioseguridad	33
<b>4.2. RESULTADOS:</b>	<b>34</b>
4.2.1. La vacunación en base a proteoliposomas bacterianos disminuyó el recuento bacteriano en las glándulas desafiadas, pero no disminuyó el número de glándulas infectadas	34
4.2.2. La vacunación en base a proteoliposomas bacterianos protegió a las ratonas del cuadro clínico severo tras ser desafiadas experimentalmente	34
4.2.3. La vacuna en base a proteoliposomas bacterianos disminuyó el daño tisular y la infiltración inflamatoria producto del desafío bacteriano	35
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>49</b>
<b>TABLAS</b>	<b>60</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>86</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Número de glándulas mamarias positivas al cultivo bacteriológico y recuento bacteriano tisular promedio (UFC/g), por tipo de desafío intramamario (PBS estéril o inóculo bacteriano), según inóculo teórico y real utilizados (UFC/mL)	60
<b>Tabla 2.</b>	Cuantificación de patrones moleculares bacterianos en proteoliposomas de <i>E. coli</i> RM5278 según el patrón molecular evaluado y método de cuantificación	61
<b>Tabla 3.</b>	Número de hembras preñadas al día 25 del ensayo y tamaño de camada observado dentro de las 12 horas post parto, según tratamiento	62
<b>Tabla 4.</b>	Número y porcentaje de glándulas mamarias positivas al cultivo bacteriológico, por tipo de desafío intramamario (PBS estéril o inóculo bacteriano), según tratamiento	63

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Establecimiento de un modelo experimental de mastitis clínica coliforme en ratonas lactantes.	64
<b>Figura 2.</b>	Patrón de proteínas totales de proteoliposomas de la <i>E. coli</i> RM5278.	65
<b>Figura 3.</b>	Electroferograma del patrón de proteínas totales entre distintas fracciones obtenidas durante la producción de proteoliposomas de <i>E. coli</i> RM5278.	66
<b>Figura 4.</b>	Visualización de material genético bacteriano en proteoliposomas de <i>E. coli</i> RM5278 mediante electroforesis en geles de agarosa-TAE.	67
<b>Figura 5.</b>	Visualización y estimación de parámetros físicos en un lote de proteoliposomas de <i>E. coli</i> RM5278 mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).	68
<b>Figura 6.</b>	Estimación de parámetros físicoquímicos de proteoliposomas de <i>E. coli</i> RM5278 mediante equipo Brookhaven <i>ZetaPlus</i> .	69
<b>Figura 7.</b>	Diseño del ensayo de vacunación e infección experimental en modelo murino.	70
<b>Figura 8.</b>	Desafío intramamario y análisis <i>post mortem</i> de glándulas mamarias.	71
<b>Figura 9.</b>	Niveles (OD <sub>450</sub> ) de IgG total específica en sangre de ratonas vacunadas.	72
<b>Figura 10.</b>	Niveles (OD <sub>450</sub> ) de IgG1 específica en sangre.	73
<b>Figura 11.</b>	Niveles (OD <sub>450</sub> ) de IgG2a específica en sangre.	74
<b>Figura 12.</b>	Niveles (OD <sub>450</sub> ) de inmunoglobulinas específicas en glándula mamaria.	75
<b>Figura 13.</b>	Detección de IgA total en glándula mamaria.	76
<b>Figura 14.</b>	Detección de IgG total en glándula mamaria.	77
<b>Figura 15.</b>	Detección de IgG1 total en glándula mamaria.	78
<b>Figura 16.</b>	Detección de IgG2a total en glándula mamaria.	79
<b>Figura 17.</b>	Análisis bacteriológico cuantitativo de glándulas mamarias.	80
<b>Figura 18.</b>	<i>Score</i> clínico post desafío bacteriano.	81
<b>Figura 19.</b>	Lesiones macroscópicas al examen <i>post mortem</i> .	82
<b>Figura 20.</b>	Lesiones microscópicas del parénquima mamario.	83
<b>Figura 21.</b>	Recuento de células totales en parénquima mamario.	84

## RESUMEN

*Escherichia coli* es un importante agente causal de mastitis clínica y es el principal causante de mastitis sobreaguda durante el periodo de transición. Dado que las vacunas actualmente disponibles para prevenir la mastitis coliforme han mostrado eficacia limitada, este estudio evaluó una nueva vacuna en base a proteoliposomas bacterianos, formulados a partir de una cepa de campo y emulsionados en hidróxido de aluminio. Tras estandarizar un modelo murino de mastitis clínica coliforme aguda, ratonas BALB/c fueron vacunadas por vía subcutánea con 2 dosis separadas por 21 días. A los 7–10 días post parto, las ratonas fueron desafiadas por vía intramamaria con una cepa homóloga, evaluando la respuesta inmune y eficacia de la formulación vacunal. Tras la administración de la vacuna, las ratonas no mostraron signos clínicos deletéreos ni alteraciones en los parámetros reproductivos. Ya desde el día 21 post vacunación, las ratonas inmunizadas mostraron un marcado aumento en los niveles sanguíneos de IgG ( $P < 0,0001$ ), IgG1 ( $P < 0,0001$ ) e IgG2a ( $P = 0,0054$ ) antígeno específicas. Tras el sacrificio a las 48 horas post desafío, los tejidos mamarios mostraron un marcado aumento en los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a ( $P = 0,0012$ ; para los 3 isotipos), no detectándose diferencias en los niveles de IgA específica ni en los niveles de inmunoglobulinas totales. La evaluación clínica a las 20, 30 y 48 horas post desafío demostró que las ratonas vacunadas fueron protegidas del desarrollo de un cuadro clínico agudo y severo ( $P < 0,0001$ ;  $P = 0,0009$  y  $P = 0,0001$ ; respectivamente). Además, tras el análisis bacteriológico de los tejidos mamarios, se observó que las ratonas vacunadas mostraron una disminución de  $5,419 \log_{10}$  UFC/g en el recuento bacteriano tisular ( $P = 0,0012$ ), respecto a las ratonas no vacunadas. El análisis histopatológico sólo reveló cambios inflamatorios leves a moderados y el recuento de células totales en secciones mamarias fue la mitad del observado en las ratonas no inmunizadas ( $P = 0,0025$ ). En base a los resultados obtenidos, la vacuna en base a proteoliposomas bacterianos fue segura, altamente inmunógena y eficaz, alzándose como una segura y eficaz herramienta para el control de infecciones bacterianas.

**Palabras clave:** proteoliposomas, mastitis, modelo murino, *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is an important etiological agent of clinical mastitis and the main cause of severe acute mastitis during the transition period. Given that the currently available vaccines for coliform mastitis have shown limited efficacy, this study evaluated a new vaccine based on bacterial proteoliposomes, formulated from a field bacterial strain and emulsified in aluminum hydroxide. After standardizing a murine model of acute coliform clinical mastitis, BALB/c female mice were subcutaneously vaccinated with 2 doses separated by 21 days. At 7–10 days postpartum, the mice were intramammary challenged with homologous strain, evaluating the immune response and efficacy of the vaccine formulation. After the administration of vaccine, the mice did not show deleterious symptom or alterations in reproductive parameters. Already from day 21 post vaccination, the immunized mice showed marked increase of specific IgG ( $P < 0.0001$ ), IgG1 ( $P < 0.0001$ ) and IgG2a ( $P = 0.0054$ ) in blood. After sacrifice at 48 hours post challenge, mammary tissues showed a marked increase in IgG, IgG1 and IgG2a levels ( $P = 0.0012$ ), without differences in specific IgA or total immunoglobulin levels. Clinical evaluation at 20, 30 and 48 hours post challenge showed that vaccinated mice were protected from development of acute and severe clinical disease ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0009$  and  $P = 0.0001$ , respectively). Additionally, after bacteriological analysis of mammary tissues, vaccinated mice showed at decrease of  $5.419 \log_{10}$  CFU/g in the tissue bacterial count ( $P = 0.0012$ ) respect to unvaccinated mice. Histopathological analysis revealed only slight to moderate inflammatory changes and total cells count in mammary sections was half that detected in non-immunized mice ( $P = 0.0025$ ). Based on the obtained results, vaccine based on bacteriological proteoliposomes was safe, highly immunogenic and effective, rising as a safe and effective tool for the control of bacterial infections.

**Key words:** proteoliposomes, mastitis, murine model, *Escherichia coli*.

## I. INTRODUCCIÓN

La mastitis corresponde a una condición inflamatoria de la glándula mamaria ocasionada principalmente por agentes infecciosos y es sindicada como la principal causa de pérdidas económicas para la industria lechera. A nivel internacional, los costos han sido estimados en €147–240/vaca/año, según la incidencia predial y otros factores intrínsecos de la región en estudio [1]–[3]. Dentro de los agentes infecciosos causales, *Escherichia coli* es aislado con frecuencia en cuadros de mastitis clínica, causando importantes pérdidas económicas principalmente atribuidas a la menor producción de leche, descarte de leche alterada y costos de tratamiento [4], [5]. Además, esta bacteria es la principal causante de cuadros sobreagudos durante el periodo de transición, producto de la desmedida producción local de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-6, desencadenando un cuadro sistémico severo que suele llevar a la postración y muerte las hembras [6]–[9]. Las medidas profilácticas usualmente aplicadas, tales como el *dipping* post ordeña y la terapia de secado, son ineficaces para el control de la mastitis coliforme, debido a la exposición continua de la punta del pezón y la naturaleza ubicua de estos patógenos en el ambiente de las vacas [10]. A pesar de la existencia de vacunas en el mercado nacional e internacional (bacterinas J-5), éstas no disminuyen la incidencia de infección ni logran reducir en forma consistente los recuentos bacterianos en la leche de las vacas enfermas [9], [11]–[13]. Parte de su ineficacia puede ser atribuida a los mecanismos de inactivación bacteriana, tales como el tratamiento con formaldehído, el cual altera la estructura de las proteínas y otros componentes bacterianas con potencial rol inmunoestimulante [14], [15]. No obstante, los mecanismos inmunitarios involucrados en la protección inducida por las bacterinas J-5 son escasamente comprendidos, aunque se especula que reforzarían el reclutamiento local de neutrófilos mediante linfocitos Th1 [16]. Está demostrado que los neutrófilos son esenciales para el control de las infecciones intramamarias y la resolución favorable de las mastitis por *E. coli* depende del rápido y temprano reclutamiento de neutrófilos activos hacia la glándula mamaria [7], [10], [17], [18]. Por tanto, el correcto funcionamiento del sistema neutrófilos–anticuerpos opsonizantes (lo cual podría ser favorecido mediante el uso de una vacuna eficaz), debería prevenir o minimizar los síntomas locales y sistémicos de la mastitis coliforme [17], [19]–[21]. El empleo de proteoliposomas de origen bacteriano como antígenos vacunales para la prevención de infecciones ha sido escasamente descrito [22], a pesar del amplio uso de los liposomas como agentes adyuvantes [23]–[25], no existiendo a la fecha literatura disponible sobre su uso como agentes antigénicos y/o adyuvantes para el control de la mastitis. Por otra parte, los modelos murinos de mastitis clínica ofrecen importantes ventajas para el estudio de la fisiopatología de la infección intramamaria y para la evaluación de la eficacia de agentes antimicrobianos o inmunoestimulantes, debido a su bajo costo, facilidad de implementación y similitud con la fisiología

mamaria de la especie bovina. No obstante, a pesar de su uso en el desarrollo de vacunas para la prevención de mastitis por *S. aureus* [26]–[34], existe escasa información sobre el uso de modelos murinos de mastitis por *E. coli* [17], [18], [35], [36], y no existe información sobre su uso para la validación de vacunas contra la mastitis por *Escherichia coli*. En este estudio se describe la formulación y análisis de parámetros físicos y bioquímicos de proteoliposomas generados a partir de una cepa de campo de *Escherichia coli*. Luego, los proteoliposomas fueron utilizados para la formulación de una vacuna vehiculizada con hidróxido de aluminio, la cual fue administrada por vía subcutánea a ratonas gestantes. Tras el parto, se estableció un modelo experimental de mastitis clínica aguda mediante el desafío intramamario de las ratonas con una cepa bacteriana homóloga, sobre el cual se evaluó la seguridad, potencial inmunoestimulante y eficacia de la vacuna.

## II. ESTADO DEL ARTE

### A. MASTITIS BOVINA

#### 1. Definición general

Mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria, caracterizada por alteraciones físicas y químicas en la leche asociadas al proceso patológico [37]. En general, se describen 2 formas básicas de presentación: mastitis subclínica y clínica. La primera se caracteriza por no provocar signos evidentes en la glándula ni en la leche, por lo cual su diagnóstico requiere de pruebas complementarias. El recuento de células somáticas en leche (RCS) es frecuentemente usado como medida de la inflamación mamaria, siendo 200.000 células/mL el punto de corte para distinguir un cuarto con o sin mastitis subclínica. Por su parte, la mastitis clínica se caracteriza por la alteración de la leche y cambios inflamatorios en la glándula mamaria, pudiendo asociarse a reacciones sistémicas [38].

#### 2. Pérdidas económicas asociadas a mastitis

Mastitis es la principal causa de pérdidas económicas para la industria lechera en el mundo [39], [40]. Los costos directos asociados a esta enfermedad incluyen la disminución en la producción y calidad de la leche, leche descartada, gastos veterinarios (honorarios e insumos) y mayor requerimiento de mano de obra. Los costos indirectos, no siempre evidentes para el productor, incluyen el mayor riesgo de desórdenes sanitarios subsecuentes, menor fertilidad, mayor riesgo de eliminación y mortalidad [3], [5], [39]. El costo de estos factores varía considerablemente entre países y entre regiones. Así mismo, los estudios disponibles en la literatura emplean diferentes modelos y herramientas de estimación económica, por lo cual la comparación entre ellos debe ser realizada con discreción [40].

Cha *et al.* [41] estimaron los costos por cada caso de mastitis clínica en US\$134 para bacterias Gram positivas y US\$211 para Gram negativas, considerando una incidencia de 15,5 y 12,6 casos/100 vacas/año, respectivamente; además, los autores estimaron que la mayor contribución a los costos totales fueron los asociados a tratamientos (>51%) para Gram positivos y pérdidas en producción láctea (>72%) para Gram negativos. En otro estudio, Heikkilä *et al.* [1] calcularon los costos de la mastitis en €458 por cada caso clínico o €147/vaca/año, considerando una incidencia clínica de 0,31–0,38 casos/vaca/año. En forma más reciente, van Soest *et al.* [2] estimaron los costos totales de la mastitis en €240/vaca/año, de los cuales la mitad se atribuyeron a “costos preventivos” (medidas implementadas para prevenir la mastitis), mientras la otra mitad se asociaron a “costos de falla” (tras la ocurrencia de mastitis por la falla de las medidas preventivas). Dentro de los €120/vaca/año asociados a los “costos de falla”, €32 se

debieron a menor producción de leche, €20 al descarte de leche y €20 a eliminación de vacas enfermas. También recientemente, Getaneh *et al.* [3] estimaron los costos totales de mastitis para un rebaño de 8 hembras en ordeña en €280/año (€35/vaca/año), considerando una incidencia anual de 21,6 y 36,2% para mastitis clínica y subclínica, respectivamente. Además, los autores calcularon el costo promedio de un caso de mastitis clínica en €151,4 y de un caso subclínico en €6,13.

### 3. Epidemiología

Más del 95% de las mastitis son causadas por agentes “ambientales” como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Streptococcus uberis* (*St. uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* y *Staphylococcus coagulasa*–negativos (SCN); y agentes “contagiosos” como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Streptococcus agalactiae*. El 5% restante corresponde a organismos ocasionales [42]–[44]. La prevalencia de mastitis en los planteles lecheros es relativamente alta, siendo la presentación subclínica la principal en rebaños modernos, donde excede el 20–50% de las vacas [44]. Los coliformes de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* son la principal causa de mastitis clínica en rebaños bien manejados con bajo RCS en leche de estanque y causan la mayoría de los casos sobreagudos resultantes en la eliminación de animales [10].

El ganado lechero es especialmente susceptible a la mastitis durante el parto, debido a una disminución en los mecanismos de defensa de la glándula mamaria [20], [45]. Para la mastitis coliforme, la tasa de neoinfecciones es mayor durante el periodo seco, siendo aún mayor la susceptibilidad las 2 semanas post secado y las 2 semanas pre parto [10]. Se ha demostrado que cerca del 65% de los casos clínicos coliformes que ocurren en los 2 primeros meses de lactancia corresponden a infecciones adquiridas durante el periodo seco [46]. Aunque la prevalencia de mastitis coliforme dentro de los rebaños suele exceder el 5% de los cuartos, más del 25% de las vacas son diagnosticadas anualmente con mastitis clínica coliforme debido a que éstas tienden a ser de corta duración [10], [46]. Si bien esta prevalencia suele ser suficiente para causar RCS en leche de estanque mayor a 400.000/mL, cerca del 85% de las infecciones por coliformes causarán mastitis clínica. Por lo tanto, incluso rebaños con bajos RCS podrían tener problemas de mastitis coliforme y generalmente se asociarán a casos clínicos [47]. Además, los coliformes son la principal causa de enfermedad sistémica derivada de mastitis, siendo responsables del 60–70% de los casos clínicos sobreagudos [7], [10]. Las tasas de neoinfecciones y mastitis clínicas son más altas en los meses de verano para hembras bajo confinamiento permanente, asociadas con el aumento en los recuentos de bacterias Gram negativas en el material de cama en los meses cálidos. Al contrario, las vacas a pastoreo muestran un aumento en las tasas de mastitis clínica durante los meses húmedos y lluviosos. También existe un aumento en las tasas de mastitis clínica coliforme asociado a la paridad, siendo más susceptibles las hembras viejas [7], [10], [47].

#### **4. Situación nacional**

Durante la década pasada, San Martín *et al.* [48] aislaron 449 cepas desde 963 muestras de leche de la zona central y 1.012 cepas desde 2.000 muestras de la X región. En la zona central se observó un fuerte predominio de bacterias Gram negativas (45,2%), principalmente *E. coli* (40,8%); además, se obtuvo un importante aislamiento de *S. aureus* (16,25%) y SCN (16,04%). Por otra parte, en la X región el principal agente aislado fue *S. aureus* (55,53%), seguido por SCN (26,78%) y *Streptococcus* spp. (5,33%). Recientemente, Reyes-Jara *et al.* [43] analizaron 386 muestras de leche provenientes de vacas con mastitis clínica y subclínica de las zonas centro y sur del país, abarcando 16 predios lecheros. De estas muestras, los autores lograron aislar 386 patógenos como causa atribuible a mastitis. En la zona central se observó una importante participación de *E. coli* (33%) y SCN (33%) en cuadros clínicos, mientras que SCN (31%) y *Corynebacterium* spp. (22%) predominaron en la mastitis subclínica. Un patrón distinto fue observado en la zona sur, donde para los cuadros clínicos y subclínicos, respectivamente, se aislaron predominantemente *St. uberis* (22 y 13%), *S. aureus* (21 y 30%) y SCN (18 y 25%).

#### **5. *Escherichia coli* como patógeno mastítico**

*E. coli* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia de las enterobacterias. Se distinguen 2 clases de cepas: inofensivas (apatógenas) y aquellas que causan una amplia variedad de infecciones clínicas (patógenas) [49]. *E. coli* se adhiere a la mucosa del colon y es masivamente excretada con las heces, por tanto, es una bacteria ubicua en el ambiente de la vaca y se comporta como patógeno oportunista [47]. Al contrario de las cepas enteropatógenas y septicémicas, las cuales conforman un número de serotipos relativamente bajo, los aislados de mastitis pertenecen a un número grande de serogrupos [49]. Los estudios epidemiológicos no han demostrado que serotipos específicos de *E. coli* estén envueltos en la mastitis, ni que estas cepas compartan un *set* común de factores de virulencia [50], [51]. Así, su patogenicidad no se basaría en factores de virulencia específicos, sino en los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son compartidos por todas las cepas de *E. coli*, tales como el lipopolisacárido (LPS), flagelina y CpG–DNA, y son detectados por el sistema inmune innato [16], [49]; por lo tanto, las diferencias en la severidad clínica de la infección serían más bien atribuibles a la capacidad inmunológica de la vaca [7], [47]. Blum *et al.* [21] describieron ciertas diferencias en la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria, RCS y niveles de citoquinas (TNF– $\alpha$ , IL–6 e IL–17), tras desafiar a vacas lecheras con distintas cepas de *E. coli* asociadas a mastitis clínica. Sin embargo, el estudio contemporáneo de Leimbach *et al.* [51] comparó filogenéticamente un amplio número de cepas comensales y patógenas de *E. coli*, no logrando detectar ningún rasgo genético específico atribuible a patogenicidad mamaria.

## 6. Patogénesis

La glándula mamaria está expuesta a diversas bacterias durante los periodos secos y de lactancia, las cuales pueden ingresar a través del pezón multiplicándose a lo largo de su canal o por propulsión dentro de su cisterna debido a fluctuaciones de vacío durante la ordeña [52]. Tras la invasión, macrófagos locales y células epiteliales liberan factores quimioatrayentes, gatillando la migración de leucocitos desde la sangre, especialmente neutrófilos, cuya proporción aumenta desde el 5–25% a sobre el 90% del total de células en la leche [53]. Por lo tanto, el *peak* del recuento bacteriano en la glándula y la severidad clínica dependen de la velocidad y eficiencia de la respuesta de los neutrófilos [7], [17], [18]. A nivel local, si la infección no es controlada por las defensas celulares, las bacterias comienzan a dañar el epitelio mamario. El LPS, principal factor de virulencia de las Gram negativas, es liberado de las bacterias durante su multiplicación y lisis, iniciando una respuesta inflamatoria [47]. Además, *E. coli* daña directamente el epitelio mediante la producción de proteasas, incluyendo enzimas colagenolíticas, que contribuyen a la degradación de la matriz extracelular, conllevando a apoptosis y necrosis epitelial [54], [55]. Por otra parte, los neutrófilos promueven la injuria tisular y alteran la función mamaria mediante la generación de especies reactivas de oxígeno y liberación de enzimas granulares, como elastasa, mieloperoxidasa, catepsinas y metaloproteinasas de matriz [7], [19], [56]. Si la infección persiste, el RCS en la leche continúa aumentando y el daño tisular empeora, los alveolos mamarios pierden integridad estructural y se altera la barrera hematólactea [54]. La entrada de fluido extracelular a la glándula genera cambios visibles en la leche y la ubre, tales como edema, enrojecimiento y coagulación/aguado de la leche, comenzando así los síntomas clínicos [52], [54].

Aunque gran parte del LPS es detoxificado localmente, si los recuentos bacterianos son muy elevados se produce absorción de LPS hacia la circulación, junto a citoquinas proinflamatorias (como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) y metabolitos tóxicos [7], [57]. Algunos efectos asociados al LPS y factores proinflamatorios (sobre todo TNF- $\alpha$ ) incluyen fiebre, cambios en el número de leucocitos circulantes, activación del complemento y macrófagos, aumento de la permeabilidad vascular y cambios en los niveles plasmáticos de metabolitos, minerales, proteínas de fase aguda y hormonas. La disminución en la producción de leche durante la mastitis coliforme resulta directa e indirectamente de los efectos locales y sistémicos del LPS [16], [21], [49]. A este nivel las hembras cursan con signos graves de endotoxemia y, sin soporte clínico, suelen morir dentro de 6 horas post inicio de los signos clínicos [6], [7], [16], [58]. Sordillo *et al.* [59] demostraron que los monocitos aislados de vacas lecheras periparturientas producen más TNF- $\alpha$  tras ser estimuladas con LPS, respecto a monocitos de vacas en lactancia media y tardía. Por tanto, la mayor habilidad de poblaciones celulares locales para producir este potente mediador proinflamatorio cercano al parto podría explicar la mayor frecuencia de mastitis coliforme aguda durante el parto [20].

## 7. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria y respuesta inmune a mastitis

La glándula mamaria es protegida de los patógenos gracias al sistema inmune innato y adquirido, los que interactúan estrechamente para entregar protección. La inmunidad innata predomina en las etapas tempranas de la infección y es mediada por macrófagos, neutrófilos, “*natural killer*” (NK) y citoquinas. Este sistema reconoce y responde a diferentes patógenos, incluso si éstos invaden la glándula por primera vez, reconociendo PAMPs bacterianos mediante “*Toll-like receptors*” (TLRs) presentes en membranas celulares y endosomales, como TLR4 (reconoce LPS de bacterias Gram negativas), TLR5 (reconoce flagelina) y TLR9 (reconoce dí nucleótidos CpG no metilados en el DNA bacteriano) [60]–[65].

El canal del pezón es la primera línea de defensa antibacteriana, al poseer músculos esfínteres que mantienen el conducto cerrado y estar revestido con queratina, la cual posee propiedades antimicrobianas y proporciona una barrera física adicional [20]. Tras la penetración bacteriana, la segunda línea de defensa consiste en neutrófilos, macrófagos y linfocitos, los cuales regulan la respuesta inmune innata y adquirida [52]. La glándula y la leche sanas contienen mayoritariamente macrófagos, mientras los tejidos y secreciones infectados contienen principalmente neutrófilos [20]. A nivel mamario, los macrófagos locales reconocen a los patógenos invasores e inician la respuesta secretando citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , las cuales inducen el reclutamiento de neutrófilos y promueven su actividad bactericida [6], [17], [60], [66]. Además, las células epiteliales reclutan neutrófilos secretando TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 tras la adherencia bacteriana o su interacción con toxinas [6], [8], [36], [67], [68]. Las citoquinas secretadas por macrófagos y células epiteliales activan la expresión endotelial de moléculas de adherencia, promoviendo la unión y migración de neutrófilos sanguíneos hacia los sitios de infección o la leche [17], [69]. La severidad de la mastitis coliforme depende en gran medida de la velocidad con la cual los neutrófilos se mueven desde la sangre hacia la glándula mamaria. Dado que algunas bacterias pueden doblar su población cada 30–40 minutos, se requiere un rápido reclutamiento de neutrófilos y anticuerpos opsonizantes (especialmente del isotipo IgG2) durante las primeras 12–18 horas post infección [10], [16], [19], [56]. Los neutrófilos reclutados eliminan a los patógenos mamarios mediante sus mecanismos básicos de fagocitosis, degranulación y netosis [19], [70], aunque estas funciones se encuentran desmejoradas durante el parto, lo cual se asocia a una mayor incidencia de mastitis [52].

Si la bacteria invasora sobrevive, la infiltración de neutrófilos es reemplazada tras un corto periodo con linfocitos T, linfocitos B y monocitos [71]. Los linfocitos reconocen una amplia variedad de antígenos mediante receptores de membrana que definen las características de especificidad, diversidad y memoria inmunológica. Los linfocitos T son clasificados en 2 grupos: T $\alpha\beta$ , que incluyen a los CD4<sup>+</sup> (“*helpers*”) y CD8<sup>+</sup> (citotóxicos o supresores), y T $\gamma\delta$ . En la glándula mamaria sana predominan los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, mientras que en la mastitis son activados mayormente linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras el reconocimiento

de antígenos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II sobre células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales [72]. Estas células activan linfocitos y macrófagos y, según el repertorio de citoquinas producido, la respuesta T “*helper*” puede facilitar una respuesta inmune celular (tipo Th1) o humoral (tipo Th2) [20]. Se ha demostrado que durante el periparto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> producen menos IL-2 e IFN- $\gamma$  (asociadas a respuestas Th1) y más IL-4 e IL-10 (asociadas a respuestas Th2), respecto a linfocitos obtenidos durante etapas más tardías de la lactancia, lo cual ha sido correlacionado con una mayor susceptibilidad a mastitis [73]. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> eliminan células hospederas que expresan antígenos extraños (asociados a MHC clase I) y controlan la respuesta inmune al inhibir la activación de estas células durante la infección [16]. Las funciones inmunoregulatorias de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> dependen fuertemente de la etapa de la lactancia: en lactancia media muestran actividad citotóxica y expresan principalmente IFN- $\gamma$ , mientras que en el periparto no muestran actividad citotóxica y expresan principalmente IL-4 [74]. Esto sugiere que un mayor tráfico de linfocitos T CD8<sup>+</sup> supresores hacia la glándula mamaria durante el periparto podría explicar la menor respuesta de las poblaciones linfocitarias locales, respecto a los linfocitos obtenidos en etapas más avanzadas de la lactancia [20]. La principal función de los linfocitos B es producir anticuerpos contra los patógenos invasores, a los cuales reconoce específicamente mediante sus receptores de membrana. Al igual que células dendríticas y macrófagos, actúan como CPA profesionales, internalizando, procesando y presentando antígenos asociados a MHC clase II a los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Una vez que el antígeno es presentado, los linfocitos T secretan IL-2, la cual induce la proliferación y diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos o hacia células de memoria. Al contrario de los linfocitos T, el porcentaje de linfocitos B permanece relativamente constante a lo largo de la lactancia [20].

Los principales efectores solubles de la respuesta inmune específica son las inmunoglobulinas (Ig), producidas por linfocitos B activados. Existen 4 clases con participación en la defensa de la glándula mamaria: IgG1, IgG2, IgA e IgM [20]. Los isotipos IgG1, IgG2 e IgM actúan como opsoninas, promoviendo la fagocitosis por parte de neutrófilos y macrófagos. Además de ser opsoninas, neutralizan toxinas, interfieren con la adherencia bacteriana e inducen la lisis de los patógenos invasores. IgA no participa en la opsonización, pero induce la aglutinación de bacterias, previniendo su diseminación [75]. IgG1 es el principal isotipo de IgG presente en las secreciones mamarias sanas, mientras IgG2 aumenta fuertemente durante la inflamación [52], [75]. En vacas lecheras se ha demostrado que la concentración de IgG en la sangre es menor al parto y se ha sugerido que los menores niveles del isotipo IgG2 se correlacionarían con una mayor incidencia de mastitis [68]. Así, los cambios en los niveles y actividad de los distintos isotipos de inmunoglobulinas en el periparto contribuyen a la inmunosupresión generalizada que conlleva a la mayor incidencia de enfermedades [20].

## **B. VACUNAS Y ADYUVANTES**

### **1. Antecedentes generales**

Tradicionalmente, las vacunas contra agentes patógenos han sido formuladas en base a organismos vivos atenuados, organismos completos inactivados o toxinas bacterianas inactivadas y son, a menudo, lo suficientemente inmunogénicas como para inducir memoria [76]. La memoria inmunológica es un activo central del sistema inmune, que depende de la generación de linfocitos T y B específicos de larga vida y óptimamente reactivos [77], [78]. Aunque el perfil de la respuesta inmune preferido por una vacuna depende principalmente del agente infeccioso contra el cual está dirigida, así como del adyuvante empleado, ésta siempre debe inducir memoria inmunológica [79]. Las vacunas tradicionales basadas en el concepto de “célula completa” poseen capacidad inmunoestimulante intrínseca; sin embargo, las técnicas tradicionales de inactivación, como el tratamiento con formaldehído, alteran la estructura química de las proteínas con potencial antigénico, limitando su procesamiento por parte de CPA profesionales y, por lo tanto, restringiendo la presentación antigénica a células T y la generación de células de memoria [14], [15], [80]. Por otra parte, la atenuación de patógenos permite la generación de organismos no patógenos, los cuales imitan la infección natural y, por lo tanto, inducen una fuerte respuesta celular y humoral [76]. No obstante, las vacunas atenuadas han sido asociadas a efectos adversos, algunos de ellos severos e incluso fatales [81]. La seguridad es una de las principales preocupaciones en el desarrollo de vacunas y limita el desarrollo de vacunas atenuadas, dado que estas podrían causar enfermedad en pacientes inmunocomprometidos o revertir su virulencia [82]. Considerando estas limitaciones, en las últimas décadas han surgido nuevas estrategias en el desarrollo de vacunas, alejándose del enfoque clásico basado en células completas atenuadas o inactivadas, y volcándose hacia tecnologías más seguras, como las vacunas subunitarias y fraccionadas [76].

### **2. Adyuvantes**

Los adyuvantes son compuestos que mejoran la respuesta inmune específica contra los antígenos con los cuales se inoculan [83], [84]. Éstos pueden ser usados con varios propósitos: 1) mejorar la inmunogenicidad de antígenos altamente purificados o recombinantes; 2) reducir la cantidad de antígeno o el número de vacunaciones necesarias para generar inmunidad protectora; 3) mejorar la eficacia de las vacunas en recién nacidos, individuos seniles o inmunocomprometidos; 4) como sistema de liberación de antígenos para su absorción en mucosas [85], [86]. Algunos factores por considerar en la elección de adyuvantes son el antígeno usado, especie de destino, ruta de administración y probabilidad de efectos adversos. Idealmente, los adyuvantes deben ser estables, con una larga vida útil, biodegradables, baratos, no inducir inmunidad contra ellos mismos y promover una respuesta inmune apropiada (celular o

humoral) [83], [87]. Los adyuvantes suelen ser clasificados en 2 categorías, según su mecanismo de acción: sistemas de liberación y potenciadores inmunológicos [88]. Mientras los sistemas de liberación actúan presentando, agregando y dirigiendo los antígenos hacia las CPA, los potenciadores inmunológicos activan directamente a estas células a través de receptores como TLRs, proporcionando el contexto inflamatorio necesario para la amplificación de la respuesta inmune innata y la óptima activación de la respuesta inmune específica [89]. En esta última categoría se incluyen estructuras PAMPs, compuestos inmunoactivos endógenos (citoquinas) y moléculas tensoactivas [90].

Las sales de aluminio son los adyuvantes de mayor uso en seres humanos y animales [83], [91]. Éstas no sólo mejoran la respuesta inmune al extender el tiempo de permanencia del antígeno en los tejidos (“efecto de depósito”), sino que, al igual que los adyuvantes modernos, inducen directamente el reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato, principalmente macrófagos y células dendríticas, describiéndose también su habilidad para activar directamente al sistema del complemento [84], [92], [93]. Tras su inyección, las sales de aluminio inducen la liberación de señales de peligro endógenas, entre ellas DNA y ácido úrico, activando a las CPA para polarizar la respuesta inmune hacia un perfil preferentemente Th2 [94]–[96].

Después del aluminio, las emulsiones de agua en aceite o aceite en agua son los adyuvantes más usados, tales como Montanide, Adjuvante 65 y Lipovant [85]. Éstos inducen respuestas inmunes potentes, pero la alta reactogenicidad observada en los seres humanos, debida a su limitada biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como a la presencia de impurezas en las formulaciones iniciales, limitó su uso [84], [90]. Para las vacunas de uso animal, la elección de los adyuvantes se basa principalmente en la eficacia, tolerándose ciertos efectos secundarios [85], [97]. No obstante, las emulsiones de aceite mineral, especialmente las del tipo agua en aceite, han mostrado efectos secundarios severos en los animales, afectando significativamente ciertos parámetros de interés productivo [79].

### **3. Utilización de liposomas en formulaciones de vacunas**

Los liposomas son vesículas conformadas por una o más bicapas lipídicas concéntricas alternando compartimentos internos acuosos [24]. Desde los estudios iniciales en los 60’s, los liposomas han llegado a ser un sistema de transporte y liberación bien establecido en el campo de la fármaco e inmunoterapia. Como vehículos, han sido usados para el tratamiento de cáncer y enfermedades infecciosas, autoinmunes y endocrinas. Se han desarrollado sofisticadas formulaciones, demostrándose sus propiedades de inocuidad, estabilidad y biodistribución [25], [98]. Debido a su versatilidad estructural, carga eléctrica, fluidez lipídica y tamaño (descrito entre 50 nm–10 µm), así como su habilidad para incorporar diversos compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos, los liposomas son interesantes sistemas de liberación antigénica [24], [79]. Clásicamente están compuestos de fosfolípidos naturales, biodegradables, no inmunogénicos

y no tóxicos, donde los antígenos se encuentran contenidos en su interior o intercalados entre los fosfolípidos de la membrana. Dada esta capacidad, los liposomas pueden actuar como vehículos y adyuvantes al proteger a los antígenos del *clearance* orgánico, extendiendo su vida media en la sangre y asegurando una mayor exposición a CPA profesionales [85]. Además, se ha descrito su capacidad para inducir una potente respuesta inmune humoral sin la generación de granulomas en el sitio de punción ni reacciones secundarias de hipersensibilidad [25].

La potencia de los liposomas depende de varios factores, demostrándose la influencia del número de capas de fosfolípidos, el tamaño promedio, la carga eléctrica y la composición [85]. En relación al tamaño de partícula, suele observarse una marcada variabilidad entre liposomas de una misma preparación, siendo la polidispersidad una estimación de la amplitud de la distribución de los pesos moleculares [99]. La importancia del tamaño de los liposomas radica en la influencia sobre su reconocimiento por parte de CPA. Se ha descrito que los liposomas pequeños (20–200 nm) son fagocitados principalmente por células dendríticas, mientras que aquellos mayores a 500 nm son fácilmente fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear y, por lo tanto, removidos con mayor rapidez del organismo [23]. Además, el tamaño de las vesículas podría influir en el perfil de la respuesta inmune generada. Al respecto, Mann *et al.* [100] observaron que liposomas pequeños (~250 nm) favorecieron respuestas Th2, mientras que los más grandes (~980 nm) indujeron altos niveles de IFN- $\gamma$  e IgG2 propios de respuestas Th1. Con resultados opuestos, Henriksen-Lacey *et al.* [101] observaron que la encapsulación de un antígeno proteico con liposomas catiónicos de tamaños  $\leq 500$  nm indujo una mayor producción de IFN- $\gamma$  en los esplenocitos de ratones vacunados y de IL-1 $\beta$  en el sitio de inyección, aunque no detectaron diferencias en la relación IgG1/IgG2a asociadas al tamaño de partícula. No obstante lo anterior, la mayoría de los autores indican que no existe un tamaño único ideal para el uso de liposomas en vacunas [23], [102]. La carga eléctrica de los liposomas puede ser estimada a través del potencial  $\zeta$ , el cual corresponde a la diferencia de potencial entre la superficie de la partícula en movimiento y la solución. Esta característica fisicoquímica permite estimar el nivel de interacción mediante fuerzas de repulsión y atracción entre las partículas, prediciendo así su estabilidad [103], [104]. Respecto a su efectividad, los liposomas aniónicos y catiónicos inducen respuestas inmunes antígeno específicas más fuertes respecto a los de carga neutra [98], [105], probablemente debido a una mayor habilidad para interactuar con membranas celulares [25].

A la fecha, diversas formulaciones en base a liposomas como agentes adyuvantes han sido evaluadas en animales. Entre ellos, Pang *et al.* [106] administraron a pollos una vacuna oral contra *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*), basada en la proteína de fimbria SEF14 encapsulada en liposomas sintéticos, repitiendo la vacunación a los 14 días. Luego, las aves fueron desafiadas oralmente con  $2 \times 10^6$  UFC de *S. Enteritidis*. Dos semanas post vacunación, los niveles séricos de IgG e IgA específicas fueron

significativamente mayores (1:256 y 1:128, respectivamente) respecto a las aves no vacunadas. Lo mismo se observó con los niveles de IgG e IgA en *mucus* intestinal, siendo también significativamente mayores (1:256 y 1:512, respectivamente). Además, el número de linfocitos esplénicos productores de anticuerpos específicos, tras ser estimulados *in vitro* con el antígeno, fue  $150 \pm 30$  para IgG y  $140 \pm 27$  para IgA, no detectándose producción de anticuerpos en linfocitos de aves no vacunadas. El aislamiento de *S. Enteritidis* desde muestras fecales de pollos vacunados fue significativamente menor (1–3 unidades logarítmicas) respecto a las aves no inmunizadas, durante los 28 días posteriores al desafío.

Respecto a su utilización como agentes antigénicos, Roberts *et al.* [22] formularon proteoliposomas de *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) y evaluaron su eficacia inmunogénica en un modelo murino. Para ello, ratonas BALB/c fueron vacunadas por vía intranasal o intraperitoneal con una bacterina o proteoliposomas de *B. pertussis*, recibiendo un *booster* a los 14 días. Dos semanas post *booster*, las ratonas fueron desafiadas por vía intranasal con *B. pertussis* y luego fueron sacrificadas en forma seriada, recuperándose tejido pulmonar a las 2 horas y a los 5 y 8 días post desafío. Respecto a la vacunación intraperitoneal, mientras las ratonas no vacunadas mostraron recuentos bacterianos en pulmón similares en los 3 tiempos de muestreo, las ratonas vacunadas con ambas formulaciones mostraron recuentos menores en 4 unidades logarítmicas al día 5 y en 7 unidades logarítmicas al día 8, respecto a las 2 horas post desafío. Respecto a la vacunación intranasal, de igual forma, mientras el grupo no vacunado mostró recuentos similares en los 3 tiempos de muestreo, las ratonas vacunadas con ambas formulaciones mostraron recuentos menores en 2 y 3 unidades logarítmicas a los 5 y 8 días post desafío, respectivamente, con relación a las 2 horas post desafío.

#### **4. Desarrollo de vacunas contra la mastitis bovina**

Se espera que las vacunas contra la mastitis prevengan el establecimiento de nuevas infecciones intramamarias, reduzcan la frecuencia y severidad del cuadro clínico y eliminen las infecciones crónicas. Sin embargo, es ampliamente reconocido que las vacunas disponibles en el mercado no cumplen a cabalidad con estos requerimientos [20]. En los estudios iniciales se inmunizaron vacas con una cepa de *E. coli* mutante rugosa, la cual mostró disminuir la incidencia de mastitis clínica por coliformes [16], [107]. Bacterinas comerciales basadas en esta cepa como J5<sup>®</sup>, Enviracor<sup>®</sup> y J-VAC<sup>®</sup> están disponibles en el mercado hace bastante tiempo, aunque los mecanismos de activación de la respuesta inmune no están bien definidos, dado que J5 es una mezcla de antígenos. Dosogne *et al.* [16] especulan que esta vacuna actuaría reforzando el reclutamiento local de neutrófilos mediante linfocitos Th1, aunque esto no ha sido demostrado. En la actualidad, las investigaciones sobre estas vacunas están enfocadas en optimizar los tiempos de aplicación para mejorar su eficiencia y reducir costos [12], [13], [107], [108].

Entre los últimos estudios con la cepa J5, Bradley *et al.* [13] evaluaron una vacuna polivalente contra *E. coli* y *S. aureus* (Startvac®, Hipra) en 7 rebaños comerciales (1.549 vacas) de Reino Unido. Para ello, un grupo fue vacunado bajo el régimen comercial (45 días pre parto, 35 días tras la primera dosis y 52 días post parto), un segundo grupo fue vacunado cada 90 días a partir del enrolamiento y un tercer grupo participó como control no vacunado. Todas las dosis se aplicaron vía intramuscular y la eficacia de los distintos regímenes fue evaluada durante los primeros 120 días en leche. La incidencia de mastitis clínica en los 3 grupos fue mayor a 45,5 casos/100 vacas y la prevalencia fue cercana al 33%, no existiendo diferencias entre grupos. Sin embargo, las hembras vacunadas bajo el régimen comercial mostraron una significativa disminución en la severidad clínica, con un menor riesgo de desarrollar mastitis grave (*odds ratio* [OR]: 0,58), y cada dosis adicional se asoció a un menor riesgo de mastitis grave (OR: 0,87). Las tasas de eliminación hasta los 305 días en leche fueron 18,3; 24,2 y 26,2% para los 3 grupos, respectivamente, siendo significativamente menores en el grupo bajo el régimen comercial. Además, las hembras vacunadas bajo el régimen comercial produjeron significativamente más leche (231 L) y sólidos lácteos (12,36 kg), respecto a las hembras no vacunadas. Bajo las condiciones de ensayo, se estimó un retorno económico de la vacunación de 2,57:1, sólo por concepto de mayor producción láctea.

Los intentos en el desarrollo de vacunas contra la mastitis bovina han sido numerosos y con promisorios resultados bajo condiciones experimentales, no obteniéndose los mismos resultados bajo condiciones de campo [109]. Por lo anterior, al no cubrir las expectativas de los productores lecheros, su administración en rebaños comerciales es más bien escasa [107]. Esta falta de eficacia se debe, en parte, a la diversidad de patógenos involucrados, junto a la existencia de numerosas variantes serológicas dentro de una misma especie entre las que no existe protección inmunológica cruzada [49]–[51], tornándose necesaria la generación de vacunas de mayor eficacia y que cubran un espectro bacteriano más amplio.

## **C. MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE LA MASTITIS BOVINA**

### **1. Antecedentes generales**

El estudio de la mastitis en rumiantes se ve confrontado inevitablemente a mayores costos y problemas de manejo. Por esta razón, un modelo experimental de mastitis en ratones de laboratorio fue desarrollado y caracterizado por R. L. Chandler durante la década de los setenta, con cepas de campo de *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* [110]. A la fecha, el modelo ha sido replicado para el estudio de agentes antibacterianos, terapia anticancerígena e inmunomoduladores [67], [111], [112]. Actualmente, el modelo murino es considerado una herramienta de gran valor para el estudio de la patogénesis y el control de las infecciones intramamarias [67], [113].

## 2. Consideraciones sobre el modelo murino de mastitis

El modelo murino ofrece similitudes anatómicas y funcionales de considerable interés para el estudio de la mastitis bovina [49]. En forma similar a las vacas, las ratonas poseen 2 pares de glándulas mamarias en la región inguinal, además de 3 pares torácicos. Ambas especies poseen glándulas funcional y anatómicamente independientes, con sólo un conducto primario y una apertura en el pezón [110]. Como en las vacas, el modelo murino de mastitis provee un ambiente único para el desarrollo de patógenos y permite la interacción de los microorganismos con células y componentes inmunes del hospedero, además de ofrecer factores físicos como la succión, características no consideradas en los modelos *in vitro* [114]. Otros parámetros de interés como el recuento bacteriano, número de neutrófilos y cambios histopatológicos son similares entre ratonas y vacas [36], [110]. No obstante, a pesar de estas similitudes, existen algunas diferencias entre las glándulas mamarias de ambas especies. Por ejemplo, la glándula mamaria bovina contiene muchas más células fagocíticas residentes que la glándula murina y la composición de la leche difiere en términos de proteína, grasa y carbohidratos [115], [116]. Respecto al abordaje investigativo, el RCS no es llevado a cabo en las ratonas, dada la dificultad en la extracción de muestras de leche, por lo cual la intensidad de la inflamación es medida en forma indirecta mediante la observación del daño tisular, aunque se ha descrito la cuantificación celular basada en el uso de secciones histopatológicas [112]. También cabe destacar que algunas cepas de *E. coli* parecen mostrar especificidad de hospedero, como la cepa *E. coli* P4, la cual es altamente virulenta en vacas, pero causa enfermedad moderada, autolimitada o infección latente en ciertas cepas de ratones [35], [49]. Aun así, el modelo murino ofrece perspectivas adicionales muy atractivas para el estudio de la mastitis. Este modelo destaca como una alternativa barata, requiriendo sólo instalaciones estándar y experiencia básica en animales de laboratorio [67]. Además, el perfil genético similar de las cepas murinas endogámicas disminuye la variabilidad entre animales, generándose significancia estadística con menores tamaños grupales [67], [114].

En el presente estudio se evaluó la respuesta inmunológica humoral y la eficacia de una vacuna contra la mastitis por *E. coli*, formulada en base a proteoliposomas generados de la misma cepa bacteriana, en un modelo murino de mastitis clínica coliforme. Con los resultados obtenidos, se espera contribuir a la comprensión de los mecanismos inmunes de la glándula mamaria y la capacidad inmunogénica de los proteoliposomas de origen bacteriano, tanto a nivel mamario como sistémico.

### **III. HIPÓTESIS**

Una vacuna en base a proteoliposomas de *E. coli*, conformados como vesículas aniónicas de tamaño pequeño y capaces de incorporar proteínas antigénicas y PAMPs, induce inmunidad específica y disminuye el nivel de infección e inflamación del parénquima mamario, así como la severidad del cuadro clínico, en un modelo murino de mastitis clínica coliforme.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar una vacuna en base a proteoliposomas de *E. coli* y evaluar su capacidad inmunogénica y eficacia en un modelo murino de mastitis clínica coliforme.

### **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estimar la dosis mínima infectante para el establecimiento de un modelo experimental de mastitis clínica con una cepa de campo de *E. coli* en ratonas BALB/c.
2. Formular y caracterizar, mediante parámetros físico-químicos y moleculares, una vacuna en base a proteoliposomas obtenidos desde una cepa de campo de *E. coli*.
3. Evaluar la respuesta inmune humoral tras la inmunización con una vacuna de proteoliposomas de *E. coli* en un modelo murino de mastitis clínica coliforme.
4. Determinar la eficacia de una vacuna de proteoliposomas de *E. coli* sobre un modelo murino de mastitis clínica coliforme, mediante evaluación clínica, análisis bacteriológico y evaluación histopatológica de tejidos mamaros.

## 1. OBJETIVO 1:

**Estimar la dosis mínima infectante para el establecimiento de un modelo experimental de mastitis clínica con una cepa de campo de *E. coli* en ratonas BALB/c.**

### 1.1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.1.1. Animales

Se usaron 9 ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c, 6 hembras y 3 machos, de 12–14 semanas de edad. Los ratones fueron mantenidos en la Unidad de Manejo Animal del Laboratorio de Vacunas Veterinarias, Universidad de Chile, con alimento comercial (PROLAB® RMH 3000) y agua a libre demanda. Dada la necesidad de trabajar con ratonas en lactancia, se inició la sincronización sexual de las hembras mediante la adición de material de cama utilizado por machos en edad fértil durante los 4 días previos al acoplamiento. Para el inicio de la reproducción, los animales fueron divididos en 3 grupos de 2 hembras y 1 macho, y fueron alojados en jaulas de 13,0 × 18,5 × 30,0 cm. A las 48 horas post inicio de la reproducción, los machos fueron retirados de los grupos. Las prácticas de manejo y procedimientos experimentales fueron aplicados según las recomendaciones del Comité de Bioética, Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile (Anexo 1).

#### 1.1.2. Cepa bacteriana

Se utilizó la cepa nativa *E. coli* RM5278, aislada a partir de un caso de mastitis clínica bovina en la Región Metropolitana. La cepa fue previamente caracterizada mediante batería bioquímica corta y reacción de polimerasa en cadena (PCR) punto final.

#### 1.1.3. Preparación del inóculo bacteriano

La cepa nativa *E. coli* RM5278 fue sembrada en 100 mL de Infusión cerebro–corazón (AES Laboratories) e incubada a 35 °C, con agitación orbital continua, durante 18 horas. Tras la incubación, el cultivo fue centrifugado a  $2.811 \times g$ , 4 °C, por 20 minutos y el sedimento obtenido fue lavado 2 veces con *buffer* fosfato salino (PBS). Tras el lavado, la suspensión bacteriana fue ajustada con PBS al tubo 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones al décimo en PBS para obtener 3 suspensiones bacterianas a inocular, en el rango de  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL, en los grupos 1, 2 y 3, respectivamente. La concentración real de bacterias viables de cada inóculo fue corroborada mediante la siembra por diseminación en placas de Agar McConkey (AES Laboratories) y su incubación a 35 °C, durante 18 horas, tras la cual se realizó el recuento de colonias.

#### *1.1.4. Determinación de dosis mínima infectante para el establecimiento del modelo experimental*

Para el establecimiento del modelo experimental de mastitis clínica en ratonas, se empleó el protocolo descrito por Chandler [110] con modificaciones. Brevemente, 7 días post parto las crías fueron retiradas de las jaulas y sacrificadas mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Tras 2 horas post retiro de las crías, las hembras fueron anestesiadas mediante inhalación de Isoflurano hasta obtener un plano anestésico profundo. La zona ventral fue desinfectada con etanol 70% (v/v) y secada a temperatura ambiente. El 4° par de glándulas mamarias fue inoculado con 50 µL/glándula de la suspensión bacteriana respectiva a cada grupo, introduciendo una ajuga de 32G en 2/3 de su longitud a través del canal del pezón. El 3° par de glándulas mamarias fue utilizado como control negativo e inoculado con 50 µL/glándula de PBS estéril, bajo el mismo protocolo de inoculación bacteriana.

A las 48 horas post inoculación, las hembras fueron sacrificadas mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. La zona ventral fue desinfectada con etanol 70% (v/v) y, tras ser secada a temperatura ambiente, se abrió completamente desde la zona del cuello hasta la zona pélvica, permitiendo la eversión de la piel y la exposición de las glándulas mamarias. Las glándulas del 3° y 4° par fueron removidas asépticamente, pesadas con balanza analítica (XT 220–A, Precisa) y depositadas en placas de Petri estériles. Cada glándula fue homogenizada con PBS estéril, a razón de 10 mL/gramo de tejido. A partir de este homogenizado se realizaron diluciones al décimo con PBS estéril, las cuales fueron sembradas en duplicado mediante diseminación en placas de Agar McConkey (AES Laboratories) e incubadas a 35 °C durante 18 horas, tras lo cual se realizó el recuento de colonias.

Como dosis mínima infectante, se consideró la menor dosis capaz de infectar el 100% de las glándulas inoculadas, con cambios macroscópicos evidentes en el tejido mamario (tales como edema, congestión y focos abscedativos) y con recuentos bacterianos  $\geq 10^5$  UFC/gramo.

#### *1.1.5. Normas de bioseguridad*

Se utilizaron las normas de bioseguridad recomendadas por los Centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC), Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, para un nivel de bioseguridad 2, correspondiente a “*E. coli* productora de Shigatoxina (Verocitotoxina)” [117].

## 1.2. RESULTADOS

### *1.2.1. Modelo experimental de mastitis clínica coliforme en ratonas lactantes*

Sólo las dosis de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL lograron generar signos clínicos locales y sistémicos en todos los cuartos y ratonas desafiadas. La dosis de  $10^4$  UFC/mL sólo generó mastitis clínica en una de las ratonas infectadas, y de una severidad clínica visualmente menor respecto a las otras dosis.

En las ratonas enfermas, los síntomas comenzaron a manifestarse dentro de las 12 horas post inoculación y correspondieron a aumento de volumen local y congestión mamaria (visualizada transcutáneamente como un oscurecimiento del tejido glandular). En algunas ratonas se observó inflamación y congestión en los pezones, lo cual fue considerado parte del efecto traumático propio de la inoculación con aguja. Los síntomas sistémicos incluyeron anorexia, depresión, inactividad, hundimiento de costillas, aumento de la frecuencia respiratoria, postura cifótica y claudicación. Tras la eutanasia, los signos macroscópicos de patología mamaria incluyeron aumento de volumen del parénquima mamario, edema, congestión, friabilidad y consolidación (Figura 1).

Visualmente pudo establecerse una relación directa entre la gravedad de la sintomatología clínica, la severidad de los cambios macroscópicos observados a la necropsia y la magnitud de la dosis bacteriana infectante utilizada (Figura 1).

### *1.2.2. Determinación de la dosis mínima infectante para el modelo murino de mastitis clínica coliforme*

Tras la infección experimental de las hembras lactantes, los inóculos bacterianos fueron llevados al laboratorio y sometidos a bacteriología cuantitativa para corroborar la magnitud de cada uno de ellos, lo cual fue demostrado tras su incubación en Agar McConkey durante 18 horas (Tabla 1).

Dado que la dosis de  $10^4$  UFC/mL generó infección sólo en una de las ratonas y arrojó un recuento tisular promedio de  $10^3$  UFC/gramo, fue descartada del estudio (Tabla 1). Como se describió en el punto 1.2.1., las dosis del orden de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL generaron un cuadro clínico moderado a severo con cambios macroscópicos evidentes en el tejido mamario. Además, ambas dosis lograron indistintamente recuentos bacterianos tisulares del orden de  $10^7$  UFC/gramo. En base al criterio establecido en el punto 1.1.4., para los ensayos subsecuentes se seleccionó una dosis de inoculación intramamaria del orden de  $10^5$  UFC/mL (equivalente a 5.000 UFC/glándula mamaria).

## 2. OBJETIVO 2:

**Formular y caracterizar, mediante parámetros físico-químicos y moleculares, una vacuna en base a proteoliposomas obtenidos desde una cepa de campo de *E. coli*.**

### 2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1.1. Cepa bacteriana

Se utilizó la misma cepa nativa descrita en el punto 1.1.2 (*E. coli* RM5278), aislada a partir de un caso de mastitis clínica bovina en la Región Metropolitana.

#### 2.1.2. Preparación de proteoliposomas bacterianos

La cepa bacteriana fue sembrada en 500 mL de Infusión cerebro-corazón (AES Laboratories) e incubada a 35 °C, bajo agitación orbital continua durante 18 horas. Tras la incubación, el cultivo fue centrifugado a  $2.811 \times g$ , 4 °C, por 20 minutos. El sedimento obtenido fue lavado 2 veces con PBS estéril, luego fue resuspendido en un *buffer* de lisis estéril (Imidazol 20 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 500 mM; pH 7,4; 10 mL/gramo) y finalmente congelado a -80 °C durante 2 horas. La suspensión bacteriana congelada fue sometida a sonicación (Hielscher Ultrasonic Processor UP400S) a 400 Watts (24 kHz), en presencia de perlas de Zirconia/Silica 0,1 mm estériles (BioSpec Products; 1 g/10 mL), con un pulso continuo durante 6 minutos, sin sobrepasar los 50 °C, y luego fue nuevamente congelada a -80 °C durante 2 horas. Este procedimiento fue repetido hasta completar 6 pulsos de sonicación, tras los cuales la suspensión fue centrifugada a  $2.811 \times g$ , 4 °C, por 20 minutos. Tras la centrifugación, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a  $17.319 \times g$ , 4 °C, por 40 minutos, reservando el sedimento (“membranas celulares”). Este sedimento fue resuspendido en un *buffer* de solubilización estéril (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 25 mM; Deoxicolato de sodio 15 mM; 10 mL/gramo) e incubado a 17 °C, bajo agitación continua, por 18 horas. Luego la suspensión fue centrifugada a  $2.811 \times g$ , 17 °C, por 40 minutos, reservando el sobrenadante con las membranas celulares resuspendidas. La remoción del detergente desde la suspensión fue realizada mediante su incubación con Bio-Beads® (BioRad) estériles, en dos fases consecutivas de extracción, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, los Bio-Beads® se dejaron decantar y la suspensión de proteoliposomas fue rescatada asépticamente mediante jeringa estéril. El procedimiento de producción fue realizado un total de 3 veces, obteniéndose 3 lotes consecutivos los que fueron caracterizados como se detalla en el punto 2.1.3.

### 2.1.3. Caracterización de proteoliposomas bacterianos

2.1.3.a. *Cuantificación de proteínas totales mediante BCA Protein Assay Kit*: la concentración de proteínas fue medida mediante “*BCA Protein Assay Kit*” (Novagen®, Merck Millipore). Brevemente, una alícuota de la suspensión fue diluida secuencialmente al décimo con agua nanopura. Se mezclaron 25 µL de cada dilución con 200 µL de solución BCA y 4 µL de sulfato cúprico 4%., considerando además un control negativo con agua nanopura. Tras homogenizar, las muestras fueron incubadas a 35 °C durante 30 minutos. Luego de la incubación, la densidad óptica de las muestras fue medida con espectrofotómetro EPOCH (BioTek®) a 562 nm. Considerando las diluciones de la muestra, los valores de concentración de proteína total (µg/mL) fueron obtenidos a partir de los valores de densidad óptica, mediante una curva de regresión previamente construida con valores conocidos de albúmina sérica bovina.

2.1.3.b. *Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS–PAGE)*: el gel resolutivo fue preparado al 12,5% [agua desionizada, 31,06% (v/v); Tris–HCl 1,5M, pH 8,8, 24,86% (v/v); dodecil sulfato sódico 10% (p/v), 0,99% (v/v); acrilamida:bisacrilamida (30:0,8), 42% (v/v); persulfato de amonio 10% (p/v), 0,99% (v/v); N,N,N',N'–tetrametiletilenodiamina, 0,10% (v/v)]. Las muestras analizadas (sedimento bacteriano, sedimento bacteriano sonicado, sedimento de membranas y proteoliposomas) fueron ajustadas a una concentración común de proteínas, mezcladas con *buffer* de carga *3X SDS Sample Buffer* (BioLabs) y hervidas a 95 °C por 5 minutos. Luego, 25 µL de cada muestra fueron cargados en el gel concentrador. Como control, se cargaron 5 µL de estándar de peso *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). La electroforesis fue llevada a cabo con *buffer* de corrida [Tris 0,4% (p/v); Glicina 1,44% (p/v); SDS 0,1% (p/v); pH 8,3] a 170 Voltios por 60 minutos. Terminada la electroforesis, el gel fue teñido [azul brillante de Coomassie P–250 0,1% (p/v); metanol 40% (v/v); ácido acético 7% (v/v)] bajo agitación continua por 30 minutos. Finalmente, el gel fue desteñido [metanol 40% (v/v); ácido acético 7% (v/v)], bajo agitación continua, hasta la visualización de las bandas de proteínas. El gel fue fotografiado con cámara de alta resolución y posteriormente analizado mediante el software *GelAnalyzer*, versión 2010a (Dr. Istvan Lazar, D.D.R.R.).

2.1.3.c. *Ensayo Purpald para cuantificación de lipopolisacárido (LPS)*: para cuantificar el contenido de LPS en la preparación, se realizó Ensayo Purpald según el protocolo descrito por Lee y Tsai [118]. Brevemente, se prepararon diluciones de la muestra con agua nanopura, las cuales fueron cargadas en duplicado (50 µL) en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxisorp, Thermo Scientific). Se agregaron 50 µL de NaIO<sub>4</sub> 32 mM y la placa fue incubada a temperatura ambiente por 25 minutos. Tras la incubación, se agregaron 50 µL de Reactivo Purpald (Purpald® ≥ 99%, Sigma Aldrich®) 136 mM en NaOH 2N y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego se agregaron 50 µL de NaIO<sub>4</sub> 64mM y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente, se agregaron 20 µL de

isopropanol para eliminar las burbujas. La absorbancia fue medida en espectrofotómetro EPOCH (BioTek®), a una densidad óptica de 550 y 655 nm, considerándose como absorbancia final la diferencia entre ambas lecturas. La concentración de LPS (mg/mL) fue obtenida a partir de los valores de densidad óptica, mediante una curva de regresión previamente construida con valores conocidos de LPS comercial (*Lipopolysaccharides from E. coli* O111:B4; Sigma Aldrich®).

*2.1.3.d. Cuantificación de ácidos nucleicos:* para detectar la incorporación de material genético en los proteoliposomas, una alícuota fue incubada a 95 °C por 10 minutos y cuantificada directamente en espectrofotómetro Epoch (BioTek®) a 260–280 nm. Además, una muestra fue sometida a extracción de DNA mediante fenol–cloroformo básico, según el protocolo descrito por Cheng y Jiang [119]. Brevemente, a 200 µL de la muestra se adicionaron SDS (Winkler Ltda.) 1% (p/v) y 1 volumen de fenol–cloroformo (Winkler Ltda.). Luego se centrifugó a 14.000 ×g por 10 minutos, recuperándose el sobrenadante. Se volvió a adicionar 1 volumen de fenol–cloroformo y se centrifugó a 14.000 ×g por 10 minutos, recuperándose el sobrenadante. Se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto, 1/10 volumen de solución de acetato de sodio 3M pH 5,2 (Winkler Ltda.), tras lo cual la muestra fue congelada a -20 °C por 2 horas. Luego se centrifugó a 14.000 ×g por 10 minutos y el sedimento obtenido fue resuspendido en 200 µL de etanol 70% (v/v). Luego de una centrifugación a 14.000 ×g por 30 minutos, el sedimento resultante fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 100 µL de agua nanopura. Finalmente, la extracción fue cuantificada a 260–280 nm en espectrofotómetro. Además, para visualizar la incorporación e integridad del material genético, ambas mediciones fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa. Los geles fueron preparados al 0,7–1,0% (SeaKem® LE Agarose, Lonza) en *buffer* TAE (Tris 40 mM; ácido acético 19 mM; EDTA 1 mM; pH 7,5), con *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain*, 10.000 × in DMSO (Biotium®). Las muestras fueron mezcladas con *buffer* de carga (5 × DNA Loading Buffer, Blue; Biotium) y 10 µL de la mezcla fueron cargados en el gel. Como control positivo, un carril fue cargado con 1 µL de *HyperLadder™* 1 kb (BioSonda). La electroforesis fue realizada con *buffer* TAE a 90 Voltios por 60 minutos y el gel fue visualizado sobre transiluminador de luz ultravioleta.

*2.1.3.e. Microscopia electrónica de transmisión (TEM):* para la evaluación de la morfología y tamaño de los proteoliposomas, 10 µL de la suspensión fueron puestos en grillas de 300 mesh cubiertas con *FormVar/Carbon* (Electron Microscopy Sciences). Tras remover el exceso de líquido, las grillas fueron cubiertas con 10 µL de acetato de uranilo 2% por 1 minuto. Una vez secas, las muestras fueron observadas mediante microscopio de transmisión de electrones (TEM) en la Unidad de Microscopía Avanzada de la Facultad de Ciencias, Universidad Católica de Chile, operado a 80 kV. Las imágenes fueron analizadas mediante *software ImageJ* 1.51n (Dr. Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, USA).

2.1.3.f. *Medición de tamaño promedio y potencial  $\zeta$* : las mediciones del tamaño y potencial  $\zeta$  fueron realizadas con el equipo Brookhaven *ZetaPlus* (Brookhaven Instruments Corp.). Brevemente, 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de liposomas y de distintas fracciones obtenidas durante el proceso de producción (sedimento bacteriano lavado, sedimento bacteriano sonificado y sedimento de membranas) fueron diluidos en 5 mL de solución de KCl 1 nM (filtrada con filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ ) y cargados en cubetas desechables de poliestireno óptico. Las mediciones de tamaño fueron realizadas mediante dispersión dinámica de luz, mientras que para las mediciones de potencial  $\zeta$  se utilizó una sonda de paladio.

#### 2.1.4. *Análisis estadístico*

La comparación entre los parámetros físicos de los proteoliposomas, respecto a las otras fracciones del proceso productivo, fue realizada mediante análisis de varianza (ANOVA) de 1 criterio, previa corroboración de normalidad (Prueba de Shapiro–Wilk) y homoscedasticidad. Luego se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un índice de confianza (IC) de 95%. Para el análisis se utilizó el *software* estadístico *R* versión 3.4.2 (© The R Foundation). Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de  $P < 0,05$ . Los resultados fueron graficados mediante el *software* GraphPad PRISM® versión 6.01 (GraphPad Software, Inc.).

#### 2.1.5. *Formulación de vacunas y placebos*

En base a la concentración de proteínas totales (Punto 2.1.3.a.), las vacunas fueron formuladas conteniendo en cada dosis: proteoliposomas de *E. coli* RM5278: 50  $\mu\text{g}$ ; gel de hidróxido de aluminio<sup>1</sup>: 800  $\mu\text{g}$ ; agua bidestilada estéril: *c.s.p.* 200  $\mu\text{L}$ . Por su parte, los placebos fueron formulados conteniendo en cada dosis: gel de hidróxido de aluminio<sup>1</sup>: 800  $\mu\text{g}$ ; agua bidestilada estéril: *c.s.p.* 200  $\mu\text{L}$ . Las formulaciones fueron preparadas en forma aséptica bajo cámara de flujo laminar y almacenadas a 4 °C hasta su uso. Previo a la ejecución del ensayo, la esterilidad de ambas formulaciones fue demostrada mediante siembra en los medios líquidos Tioglicolato más Rezasurina (*THIO–CLAIR*, bioMérieux®) y Tripticasa Soya (Biokar Diagnostics) e incubación a 35 y 20 °C, respectivamente, durante 14 días, periodo en el cual se descartó la aparición de turbidez [120].

#### 2.1.6. *Normas de bioseguridad*

Se utilizaron las normas de bioseguridad recomendadas por los CDC, Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, para un nivel de bioseguridad 2, correspondiente a “*E. coli* productora de Shigatoxina (Verocitotoxina)” [117].

---

<sup>1</sup> Preparado por VENCOFARMA Ltda. (concentración: 51,9 mg/mL; adsorción: 17,7; sedimento: 20 mL).

## 2.2. RESULTADOS

### 2.2.1. *Los proteoliposomas incorporaron moléculas bacterianas con rol inmunoestimulante*

En la Tabla 2 se presentan los resultados (promedio  $\pm$  desviación estándar) de la cuantificación de proteínas totales, material genético y LPS en 3 lotes consecutivos de formulación de proteoliposomas. Respecto a la concentración de proteínas totales, cuantificada mediante *BCA Protein Assay Kit* (Novagen<sup>®</sup>, Merck Millipore) se obtuvo un resultado promedio de  $5.596,141 \pm 509,050$   $\mu\text{g/mL}$  para los 3 lotes. En base a este parámetro, se eligió el lote con la mayor concentración de proteínas ( $6.154,747$   $\mu\text{g/mL}$ ) para la formulación de las dosis empleadas en los objetivos 3 y 4. En la Figura 2 se presenta el patrón electroforético de proteínas totales de los 3 lotes evaluados en un gel de poliacrilamida al 12,5%. Los 3 lotes de producción muestran un patrón idéntico, tanto en el número como en la intensidad de las bandas detectadas y cuantificada por el *software GelAnalyzer2010a*. Destaca principalmente la banda cercana a los 35 kDa, la cual corresponde al 41% del contenido total de proteínas de la muestra. En forma secundaria destacan una banda en torno a los 100 kDa (6,3%), 55 kDa (5,0%), 2 bandas de entre 25–30 kDa (aproximadamente 6,0% cada una) y una banda de 15 kDa (7,0%). Un análisis comparativo entre distintas fracciones recolectadas durante el proceso productivo de un lote de proteoliposomas se muestra en la Figura 3. Mediante *software GelAnalyzer2010a* es posible detectar prácticamente el mismo número de bandas proteicas, aunque algunas de ellas varían en intensidad (y, por tanto, en participación porcentual) entre las distintas fracciones. El mayor cambio en el patrón electroforético se produce en el paso del sedimento bacteriano sonificado al sedimento de membranas. No obstante, es posible observar un alto grado de homología entre los patrones proteicos de las 4 fracciones evaluadas, dando cuenta de un alto grado de conservación del patrimonio proteico bacteriano a lo largo del proceso productivo.

La incorporación de material genético bacteriano en los proteoliposomas fue cuantificada mediante 2 técnicas. Como primera aproximación, las muestras fueron incubadas a  $95$  °C durante 10 minutos, para facilitar la liberación del DNA, y luego cuantificadas directamente en espectrofotómetro, obteniéndose un resultado promedio de  $1.102,228 \pm 114,727$   $\text{ng/mL}$  para los 3 lotes; sin embargo, se observó una relación 260/280 de  $1,347 \pm 0,042$ , dando cuenta de una considerable interferencia en la medición por parte de proteínas. En una segunda aproximación, el material genético fue extraído mediante el método estándar de fenol–cloroformo básico y luego cuantificado. No obstante, con esta metodología se obtuvo un resultado casi 30 veces menor ( $39,825 \pm 15,991$   $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) y con una pobre relación 260/280 ( $1,010 \pm 0,019$ ). Los resultados de la electroforesis en geles de agarosa–TAE (Figura 4) demuestran la incorporación de material genético en las formulaciones. Para el caso de las muestras incubadas a  $95$  °C durante 10 minutos (Figura 4.a; gel agarosa–TAE 1%) la mayor parte del material genético de los 3 lotes evaluados no logró migrar a través del gel, siendo retenido en los pocillos. El escaso material genético

capaz de atravesar el gel corresponde a DNA degradado, el cual se manifiesta sutilmente a lo largo de los carriles. Bajo un patrón distinto, el material genético extraído con el método de fenol-cloroformo básico (Figura 4.b; gel agarosa-TAE 0,7%) logró migrar a través del gel y se concentró como una banda difusa en torno a los 4.000–5.000 pb, no observándose material genético degradado sobre o bajo ella.

El contenido de LPS en los proteoliposomas fue cuantificado mediante ensayo Purpald, según el protocolo descrito por Lee y Tsai [118]. El resultado obtenido para los 3 lotes fue similar, con un promedio de  $97,890 \pm 7,548$  mg/mL.

### 2.2.2. Caracterización física de proteoliposomas

Uno lote fue seleccionado para su observación y análisis mediante TEM, cuyos resultados se presentan en la Figura 5. Los proteoliposomas fueron observados como vesículas redondas o ligeramente ovaladas, delimitadas externamente por una membrana completamente cerrada y en cuyo interior, ocasionalmente, fue posible observar fragmentos de membranas (Figura 5.b) o proteoliposomas de menor tamaño (Figura 5.a.). El tamaño promedio de las vesículas fue estimado en  $105,517 \pm 24,737$  nm, con un rango de 61,947–170,479 (Figura 5.d).

En la Figura 6 se presentan los valores del tamaño de partículas, polidispersidad y potencial  $\zeta$ , y corresponden a las estimaciones obtenidas por el equipo Brookhaven *ZetaPlus* para 3 fracciones (sedimento bacteriano, sedimento de membranas y proteoliposomas) recolectadas durante el proceso productivo de 3 lotes consecutivos. La estimación del tamaño de partículas para la fracción de sedimento bacteriano fue de  $1.591,1 \pm 63,3$  nm, valor cercano al descrito para *E. coli* en la literatura ( $500 \times 2.000$  nm) [121]. En forma importante, el tamaño promedio de partícula estimado para los proteoliposomas ( $352,2 \pm 8,7$  nm) fue significativamente mayor ( $P < 0,0001$ ) respecto al estimado para el sedimento de membranas ( $302,2 \pm 11,3$  nm). Cabe destacar que la estimación del tamaño de los proteoliposomas mediante Brookhaven *ZetaPlus* resultó significativamente mayor ( $P < 0,0001$ ) respecto a la realizada mediante TEM (Figuras 5 y 6). La polidispersidad, parámetro frecuentemente descrito para la caracterización de partículas y polímeros como medida de la heterogeneidad en la distribución de los pesos moleculares [99], arrojó valores de polidispersidad moderada (en base a la técnica de dispersión dinámica de luz, empleada por el equipo) para las 3 fracciones (sedimento bacteriano:  $0,245 \pm 0,038$ ; sedimento de membranas;  $0,172 \pm 0,021$ ; proteoliposomas:  $0,213 \pm 0,027$ ). Este parámetro fue significativamente mayor para los proteoliposomas respecto al sedimento de membranas ( $P = 0,0013$ ; Figura 6). Finalmente, la estimación del potencial  $\zeta$ , como indicador de la carga eléctrica neta de las vesículas [103], mostró valores negativos para las 3 fracciones evaluadas (sedimento bacteriano:  $-31,30 \pm 0,46$ ; sedimento de membranas;  $-33,96 \pm 0,97$ ; proteoliposomas:  $-40,33 \pm 1,03$ ), siendo estos valores significativamente distintos entre las 3 fracciones ( $P < 0,0001$ ) (Figura 6).

### 3. OBJETIVO 3:

**Evaluar la respuesta inmune humoral tras la inmunización con una vacuna de proteoliposomas de *E. coli* en un modelo murino de mastitis clínica coliforme.**

#### 3.1. MATERIAL Y MÉTODOS

##### 3.1.1. Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c de 12–14 semanas de edad, 16 hembras (28–34 g) y 8 machos. Las hembras fueron separadas en 2 grupos (vacunado y control) en jaulas de 16,4 × 25,5 × 47 cm. Por su parte, los machos fueron alojados en jaulas de 13 × 18,5 × 30 cm., hasta la reproducción. Los ratones fueron mantenidos en la Unidad de Manejo Animal del Laboratorio de Vacunas Veterinarias, Universidad de Chile, con alimento comercial (PROLAB® RMH 3000 5P00) y agua a libre demanda. Las prácticas de manejo y procedimientos experimentales fueron aprobadas por el Comité de Bioética, Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile (Anexo 1).

##### 3.1.2. Vacuna

El antígeno vacunal correspondió a proteoliposomas de la cepa nativa *E. coli* RM5278 (50 µg/dosis), emulsionados con gel de hidróxido de aluminio (800 µg/dosis) y contenidos en un volumen total de 200 µL/dosis/animal. Por su parte, el placebo correspondió a gel de hidróxido de aluminio (800 µg/dosis), contenidos en un volumen total de 200 µL/dosis/animal. La preparación de las vacunas y placebos se encuentra detallada en los puntos 2.1.2 y 2.1.5.

##### 3.1.3. Inóculo bacteriano

La cepa nativa *E. coli* RM5278 fue sembrada en 100 mL de Infusión cerebro–corazón e incubada a 35 °C, con agitación orbital continua, durante 18 horas. Tras la incubación, el cultivo fue centrifugado a 2.811 × g, 4 °C, por 20 minutos. El sedimento bacteriano obtenido fue lavado 2 veces y ajustado al tubo 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) con PBS estéril. A partir de esta solución se realizaron diluciones al décimo en PBS, hasta obtener la dosis infectante requerida ( $10^5$  UFC/mL). La concentración real de bacterias viables del inóculo fue corroborada mediante la siembra por diseminación en Agar McConkey (AES Laboratories) e incubación a 35 °C por 18 horas, tras la cual se realizó el recuento de colonias.

##### 3.1.4. Diseño experimental

En la Figura 7 se esquematiza el diseño experimental del ensayo de vacunación en modelo murino de mastitis. Al inicio del ensayo (día 0) las ratonas del grupo vacunado recibieron una dosis de la vacuna por vía subcutánea en la zona de la nuca, con aguja de 24G, mientras las ratonas del grupo control

recibieron una dosis de placebo bajo el mismo protocolo. Además, dada la necesidad de trabajar con ratonas en lactancia y evaluar la funcionalidad reproductiva como parámetro de seguridad post vacunación, simultáneamente se inició la sincronización sexual de las hembras mediante la adición durante 4 días de material de cama utilizado por machos en edad fértil. Al 5° día del ensayo se inició la reproducción de las ratonas, mediante la incorporación de machos a razón de 2 hembras/macho en jaulas de  $16,4 \times 25,5 \times 47,0$  cm. La reproducción se extendió por 72 horas, periodo tras el cual los machos fueron retirados. Una segunda dosis de la vacuna o placebo, según corresponda, fue administrada el día 21 del ensayo, bajo el mismo protocolo de la primera inmunización. El día 33 del ensayo se llevó a cabo el desafío bacteriano en ambos grupos según el protocolo descrito por Chandler [110] con modificaciones. Brevemente, las crías fueron retiradas de las jaulas y sacrificadas mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Tras 2 horas post retiro de las crías, las hembras fueron anestesiadas mediante inhalación de Isoflurano hasta lograr un plano anestésico profundo. La zona ventral fue desinfectada con etanol 70% (v/v) y secada a temperatura ambiente. El 4° par de glándulas mamarias fue inoculado con 50 µL/glándula del inóculo bacteriano, introduciendo una aguja de 32G en 2/3 de su longitud a través del canal del pezón. El 3° par de glándulas mamarias fue utilizado como control negativo e inoculado con 50 µL/glándula de PBS estéril (Figura 8). A las 48 horas post inoculación (día 35), las hembras de ambos grupos fueron sacrificadas mediante inhalación de CO<sub>2</sub>, para la extracción de glándulas mamarias.

### *3.1.5. Análisis de seguridad*

Tras la vacunación, las ratonas fueron sometidas a un protocolo de evaluación individual, adaptado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths [122] (Anexo 2), a modo de detectar alteraciones clínicas y/o conductuales asociadas a las 2 vacunaciones. Además, se evaluó el desempeño reproductivo de todas las hembras, registrándose la tasa de preñez a los 20 días post inicio del acoplamiento reproductivo (día 25 del ensayo) y el tamaño de camada observado dentro de 12 horas post parto.

### *3.1.6. Extracción y procesamiento de glándulas mamarias*

Tras el sacrificio, la zona abdominal fue desinfectada con etanol 70% (v/v) y se abrió completamente desde el cuello hasta la zona pélvica, permitiendo la eversión de la piel y la exposición de las glándulas mamarias. Las glándulas del 3° y 4° par fueron removidas asépticamente y depositadas en placas de Petri estériles. Las glándulas derechas fueron sometidas a análisis inmunohistoquímico e histopatológico (puntos 3.1.10 y 4.1.4). Por su parte, las glándulas izquierdas fueron utilizadas para el análisis bacteriológico y ELISA indirecto (puntos 3.1.10, 4.1.2–4.1.3; Figura 8).

### 3.1.7. Extracción y procesamiento de muestras de sangre

Las extracciones de sangre se realizaron los días 1, 21 y 35 del ensayo. Para la extracción de los días 1 y 21 las ratonas fueron anestesiadas mediante inhalación de Isoflurano hasta obtener un plano anestésico superficial. Una vez anestesiadas, la sangre fue obtenida mediante punción de la vena superficial temporal con agujas de 21G, y recolectada en tubos tipo Eppendorf de 0,7 mL. La muestra del día 35 fue obtenida post sacrificio mediante punción cardiaca con aguja de 21G y recolectada en tubos tipo Eppendorf de 0,7 mL. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a  $2.350 \times g$  por 5 minutos y los sueros obtenidos fueron almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.1.8. Detección de anticuerpos específicos en sangre mediante ELISA indirecto

Mediante ELISA indirecto se determinó la presencia de IgG, IgG1 e IgG2a específicas contra *E. coli* en el suero sanguíneo obtenido durante los 3 muestreos de sangre en ambos grupos experimentales. Para ello, se usaron placas de 96 pocillos de fondo plano (PolySorp™, Nunc™) para cada isotipo de anticuerpo, las cuales fueron cubiertas con 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de las 2 siguientes preparaciones antigénicas:

a) Proteoliposomas de *E. coli* RM5278: el antígeno vacunal (cuya preparación se detalla en el punto 2.1.2) fue ajustado en base a la concentración de proteínas totales (punto 2.1.3.a) a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en *buffer* de pegado ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,15M;  $\text{NaHCO}_3$  0,35 M; pH 9,6).

b) *E. coli* ATCC 25922: la cepa fue sembrada en 100 mL de Infusión cerebro-corazón e incubada a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bajo agitación orbital continua, por 18 horas. Tras la incubación, el cultivo fue centrifugado a  $2.811 \times g$  por 20 minutos y el sedimento fue lavado 2 veces con PBS estéril. Finalmente, el sedimento fue ajustado mediante nefelometría a  $1 \times 10^9$  UFC/mL en *buffer* de pegado e inactivado con fenol 1% (p/v). Además, en cada placa, se consideraron 4 pocillos como controles negativos, cubiertos sólo con *buffer* de pegado, para evaluar la unión inespecífica de anticuerpos al plástico. Para el pegado del antígeno, las placas fueron protegidas con Parafilm® M e incubadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. Luego las placas fueron lavadas 2 veces con *buffer* de lavado [Tween 20 0,05% (v/v) en PBS] y bloqueadas con *buffer* de bloqueo [leche descremada al 5% (p/v) en PBS; 150  $\mu\text{L}$ /pocillo] a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Tras 2 lavados, se agregaron los sueros diluidos a razón 1:1.000 en *buffer* de dilución [leche descremada 0,5% (p/v) en PBS] y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Las placas fueron lavadas 5 veces e incubadas con anticuerpos secundarios anti-IgG, IgG1 e IgG2a (según corresponda) de ratón conjugados con peroxidasa (dilución 1:10.000; anti-IgG: burro, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; anti-IgG1 y anti-IgG2a: cabra, Santa Cruz Biotechnology®, Inc.) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos. Finalmente, tras 5 lavados, los inmunocomplejos fueron detectados mediante la adición de un sustrato cromogénico (*1-Step™ Ultra TMB-ELISA*, Thermo Scientific) y la reacción fue detenida con un isovolumen de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. La lectura de las placas fue realizada mediante espectrofotómetro EPOCH (BioTek®) a 450 nm.

### 3.1.9. Detección de anticuerpos específicos en glándula mamaria mediante ELISA indirecto

Mediante ELISA indirecto se evaluó la presencia de IgG, IgG1, IgG2a e IgA específicas contra *E. coli* en los tejidos mamarios (“homogenizados mamarios”; punto 4.1.1.). Para ello, se usaron placas de 96 pocillos de fondo plano (PolySorp™, Nunc™) para cada isotipo, las cuales fueron cubiertas con 50 µL/pocillo de proteoliposomas de *E. coli* RM5278 (punto 2.1.2), ajustados a 40 µg/mL en *buffer* de pegado (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,15M; NaHCO<sub>3</sub> 0,35 M; pH 9,6). Además, en cada placa se consideraron 4 pocillos como controles negativos, cubiertos sólo con *buffer* de pegado, para evaluar la unión inespecífica de anticuerpos al plástico. Para el pegado del antígeno, las placas fueron protegidas con Parafilm® M e incubadas a 4 °C por 18 horas. Las placas fueron lavadas 2 veces con *buffer* de lavado [Tween 20 0,05% (v/v) en PBS] y bloqueadas con *buffer* de bloqueo [leche descremada al 5% (p/v) en PBS; 150 µL/pocillo] a 37 °C por 1 hora. Tras 2 lavados, se agregaron los homogenizados mamarios diluidos a razón 1:500 en *buffer* de dilución [leche descremada 0,5% (p/v) en PBS] y se incubaron a 37 °C por 2 horas. Las placas fueron lavadas 5 veces e incubadas con anticuerpos secundarios anti-IgG, IgG1, IgG2a e IgA de ratón conjugados con peroxidasa (dilución 1:10.000; descritos en punto 3.1.8.) a 37 °C por 45 minutos. Finalmente, tras 5 lavados, los inmunocomplejos fueron detectados mediante un sustrato cromogénico (*I-Step™ Ultra TMB-ELISA*, Thermo Scientific) y la reacción fue detenida con un isovolumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La lectura fue realizada mediante espectrofotómetro EPOCH (BioTek®) a 450 nm.

### 3.1.10. Detección de anticuerpos totales en glándula mamaria mediante inmunohistoquímica

Los anticuerpos totales a nivel local fueron cuantificados mediante inmunohistoquímica, contrastando los resultados entre ambos grupos experimentales. Para ello, las glándulas extraídas fueron fijadas en solución de formalina tamponada al 10% (v/v) y, una vez fijadas, se realizaron cortes seriados de 5 µm de espesor, los que fueron montados en portaobjetos. Para la técnica se usó el *kit* comercial *UltraVision™ LP Large Volume Detection System: HRP Polymer (Ready-To-Use)* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras fueron lavadas con PBS y rehidratadas, para luego ser bloqueadas mediante incubación con peróxido de hidrógeno 3% (v/v) a temperatura ambiente por 10 minutos y, tras 4 lavados, con solución de bloqueo *Ultra V Block* (Thermo Scientific) por 5 minutos. Tras lavar, las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora con anticuerpo primario anti IgG, IgG1, IgG2a e IgA de ratón conjugados con peroxidasa (dilución 1:100 en solución de bloqueo; anti-IgG: burro, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; anti-IgG1 y anti-IgG2a: cabra, Santa Cruz Biotechnology®, Inc.; anti-IgA: burro, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). Luego de lavar 4 veces, se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos con *Primary Antibody Enhancer* (Thermo Scientific) y se lavaron nuevamente 4 veces. Tras el lavado, se incubaron bajo oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos con *HRP Polymer* (Thermo Scientific) y se volvieron a lavar 4 veces. Luego

se incubaron con el cromógeno tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB; TecnoLab) hasta lograr la tinción adecuada. Finalmente, los cortes fueron lavados 4 veces con agua destilada, contrateñidos con Hematoxilina, deshidratados, montados y cubiertos mediante el medio de montaje *Neo-Mount*<sup>®</sup> (Merck Millipore). Las muestras fueron observadas con microscopio Olympus FSX100, fotografiadas con cámara de alta resolución y analizadas mediante *software ImageJ 1.51n* (Dr. Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, USA).

### 3.1.11. Análisis estadístico

La asociación entre la tasa de preñez al día 16 post inicio de la reproducción y el tratamiento respectivo (vacuna o placebo) fue analizada mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher. El tamaño de camada de las hembras de ambos grupos fue comparado mediante prueba de *t-Student*, previa corroboración de normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homoscedasticidad. Para el análisis de los niveles de inmunoglobulinas específicas en sangre, se construyeron modelos lineales generalizados mixtos, considerando como efectos fijos el tratamiento (placebo *v/s* vacuna) y el tiempo de medición (día 0, 21 y 35 post vacunación), mientras las ratonas (individuos) fueron consideradas como efecto aleatorio. Por otra parte, los niveles de inmunoglobulinas (totales y específicas) en glándulas mamarias, fueron comparados entre grupos experimentales mediante Prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon, con un IC del 95%. Para todos los análisis se utilizó el *software* estadístico *R* versión 3.4.2 (© The R Foundation). Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de  $P < 0,05$ . Los resultados fueron graficados mediante el *software* GraphPad PRISM<sup>®</sup> versión 6.01 (GraphPad Software, Inc.).

### 3.1.12. Normas de bioseguridad

Se utilizaron las normas de bioseguridad recomendadas por los CDC, Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, para un nivel de bioseguridad 2, correspondiente a “*E. coli* productora de Shigatoxina (Verocitotoxina)” [117].

## 3.2. RESULTADOS

### 3.2.1. La vacuna en base a proteoliposomas bacterianos fue segura en el modelo empleado

Luego de cada vacunación, las ratonas fueron observadas diariamente para la detección de signos locales o sistémicos, en base al protocolo adaptado de Morton y Griffiths [122] (Anexo 2). Tras la inoculación, las ratonas sólo mostraron un leve aumento de volumen en el sitio de punción, el cual desapareció dentro de las 24 horas post inyección. En base al protocolo, todas las ratonas mostraron un *score* clínico de 0, por lo cual los resultados no fueron analizados estadísticamente. Además, se registró el estado de preñez al día 25 del ensayo (20 días post inicio del acoplamiento reproductivo) y el tamaño de camada observado dentro de 12 horas post parto (Tabla 3). Con relación al estado de preñez al día 25, no se detectaron diferencias estadísticas entre ambos grupos ( $P = 1,0000$ ), observándose 7 ratonas preñadas en el grupo vacunado y 6 en el grupo placebo. Respecto al tamaño de camada, tampoco se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ( $P = 0,4910$ ), observándose  $10,0 \pm 1,414$  crías/hembra en el grupo vacunado y  $10,5 \pm 1,049$  en el grupo control. En base a estos resultados, la formulación en base a proteoliposomas fue segura en el modelo experimental evaluado.

### 3.2.2. La vacuna en base a proteoliposomas de *E. coli* indujo un aumento en los niveles sanguíneos de anticuerpos específicos contra la bacteria

Para la evaluación de la respuesta inmune humoral específica, se realizaron extracciones de sangre al inicio del ensayo (día 0) y a los días 21 y 35 (es decir, a los 21 días post 1° dosis y 14 días post 2° dosis). A partir de estas muestras se cuantificaron los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a contra el antígeno vacunal (proteoliposomas de *E. coli* RM5278) y contra una cepa bacteriana heteróloga (*E. coli* ATCC 25922), en base a un protocolo de ELISA indirecto previamente estandarizado. Tras la vacunación, los niveles de IgG contra el antígeno vacunal (Figura 9.a) en el grupo vacunado fueron 7,9 veces mayores al día 21 ( $P < 0,0001$ ) y 16,6 veces mayores al día 35 ( $P < 0,0001$ ), respecto al grupo placebo. Además, los niveles de IgG contra la cepa heteróloga (Figura 9.b) fueron 4,7 veces mayores al día 21 ( $P = 0,0513$ ) y 12,3 veces mayores al día 35 ( $P < 0,0001$ ) en el grupo vacunado. En forma similar, los niveles de IgG1 contra el antígeno vacunal (Figura 10.a) fueron significativamente mayores a los días 21 ( $P < 0,0001$ ) y 35 ( $P < 0,0001$ ) en el grupo vacunado, respecto al grupo placebo. Sin embargo, los niveles de IgG1 contra la cepa heteróloga (Figura 10.b) sólo fueron estadísticamente mayores en las ratonas vacunadas al día 35 ( $P < 0,0001$ ), no así al día 21 ( $P = 0,1419$ ). El mismo patrón fue también detectado para IgG2a, tanto contra el antígeno vacunal (Figura 11.a), donde se observaron niveles significativamente mayores en el grupo vacunado a los días 21 ( $P = 0,0054$ ) y 35 ( $P < 0,0001$ ), como contra la cepa heteróloga, donde sólo se detectaron niveles estadísticamente mayores en el grupo vacunado al día 35 ( $P = 0,0001$ ), pero no al

día 21 ( $P = 0,1065$ ). Al relacionar los niveles de ambos isotipos de IgG contra el antígeno vacunal en el grupo vacunado, estos mostraron una razón IgG1/IgG2a de 1,39 al día 21 y 1,65 al día 35 del ensayo.

### *3.2.3. La vacuna en base a proteoliposomas bacterianos también indujo un aumento en los niveles de anticuerpos específicos en la glándula mamaria*

Tras el sacrificio, se cuantificaron los niveles de IgG, IgG1, IgG2a e IgA específicas contra el antígeno vacunal en la glándula mamaria, en base a un protocolo de ELISA indirecto previamente estandarizado (Figura 12). Tanto para las glándulas desafiadas y no desafiadas, los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a fueron estadísticamente mayores en las ratonas vacunadas, respecto al grupo placebo. De principal interés, las glándulas mamarias desafiadas del grupo vacunado mostraron niveles 14 veces mayores de IgG ( $P = 0,0012$ ; Figura 12.a), 19 veces mayores de IgG1 ( $P = 0,0012$ ; Figura 12.b) y casi 10 veces mayores de IgG2a ( $P = 0,0012$ ; Figura 12.c), respecto al grupo placebo. Además, en glándulas desafiadas se constató una razón IgG1/IgG2a de 1,73, levemente mayor a la establecida a nivel sanguíneo al día 35. En las glándulas no desafiadas también se observaron niveles de IgG, IgG1 e IgG2a estadísticamente mayores en las ratonas vacunadas, respecto al grupo placebo ( $P = 0,0012$  en las 3 comparaciones). Respecto a los niveles locales de IgA específica, éstos no mostraron diferencias estadísticas entre ambos grupos experimentales en glándulas desafiadas ( $P = 0,0513$ ) y no desafiadas ( $P = 0,7984$ ; Figura 12.d).

### *3.2.4. La vacuna de proteoliposomas no modificó los niveles de anticuerpos totales a nivel mamario*

Mediante inmunohistoquímica se cuantificaron los niveles totales (no específicos) de IgG, IgG1, IgG2a e IgA en las glándulas mamarias desafiadas y no desafiadas de ambos grupos experimentales. En términos descriptivos, el precipitado marrón de la inmunotinción con DAB fue observado en forma similar para todas las secciones estudiadas, independiente del isotipo de anticuerpo inmunomarcado, glándula mamaria (desafiada *v/s* no desafiada) y tratamiento (vacuna *v/s* placebo), y se detectó principalmente en el tejido intersticial interlobulillar e interalveolar y, en menor medida, en los conductos intralobulillares y alveolos mamarios (Figuras 13–16). Para expresar estos resultados en forma objetiva, el precipitado marrón fue cuantificado y transformado en unidades de densidad óptica (OD) mediante el software *ImageJ* 1.51n. Para minimizar el sesgo, la cuantificación fue realizada en todas las glándulas estudiadas, considerando una fotografía completa y con el mismo nivel de magnificación para cada glándula. De esta forma, se obtuvieron los resultados de OD como promedio  $\pm$  desviación estándar para ambos grupos. Como se observa en las Figuras 13–16, ninguno de los isotipos estudiados mostró diferencias en su cuantificación al ser comparados entre glándulas (desafiadas *v/s* no desafiadas) y entre grupos. Los valores de  $P$  para las comparaciones, en glándulas no desafiadas y desafiadas, entre ambos grupos experimentales fueron, respectivamente: 0,4394 y 0,7133 para IgA (Figura 13); 0,9021 y 0,9172 para IgG (Figura 14); 0,9048 y 0,1783 para IgG1 (Figura 15); y 0,7879 y 0,9999 para IgG2a (Figura 16).

#### **4. OBJETIVO 4:**

**Determinar la eficacia de una vacuna de proteoliposomas de *E. coli* sobre un modelo murino de mastitis clínica coliforme, mediante evaluación clínica, análisis bacteriológico y evaluación histopatológica de tejidos mamarios.**

#### **4.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### *4.1.1. Procesamiento de muestras*

Como fue señalado en el punto 3.1.6, tras el sacrificio la línea media abdominal fue desinfectada con etanol 70% (v/v) y abierta completamente desde el cuello hasta la zona pélvica, permitiendo la eversión de las glándulas mamarias. Las glándulas derechas del 3° y 4° par fueron removidas y fijadas en formalina tamponada al 10% (v/v) para el análisis inmunohistoquímico e histopatológico (según puntos 3.1.10, 4.1.4 y 4.1.5; Figura 8). Las glándulas izquierdas del 3° y 4° par fueron usadas para ELISA indirecto y análisis bacteriológico cualitativo y cuantitativo (Figura 8). Para ello, las glándulas fueron removidas asépticamente, pesadas con balanza analítica (XT 220–A, Precisa) y depositadas individualmente en placas de Petri estériles. Una vez pesadas, cada glándula fue homogenizada en forma mecánica con PBS estéril, a razón de 10 mL/g de tejido. A partir de estos “homogenizados” se llevó a cabo el estudio bacteriológico cualitativo (según punto 4.1.2) y cuantitativo (según punto 4.1.3).

##### *4.1.2. Bacteriología cualitativa*

Para el análisis bacteriológico cualitativo, 100 µL de cada homogenizado fueron sembrados en 2 placas de Agar McConkey (AES Laboratories) mediante diseminación, las cuales fueron incubadas a 35 °C por 18 horas. Tras la incubación, se evaluó la presencia o ausencia de colonias bacterianas sobre el agar.

##### *4.1.3. Bacteriología cuantitativa*

A partir de cada homogenizado mamario se realizaron 6 diluciones al décimo con PBS estéril. Cada dilución fue sembrada en duplicado (100 µL/placa) y mediante diseminación en placas de Agar McConkey (AES Laboratories). Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 18 horas, periodo tras el cual se realizó el recuento de colonias. El recuento bacteriano de cada glándula fue transformado a UFC/g y, para el análisis estadístico posterior, expresado en su base logarítmica ( $\log_{10}$  UFC/g).

##### *4.1.4. Análisis histopatológico de tejidos mamarios*

Tras el sacrificio (día 35), las glándulas destinadas al análisis histológico e inmunohistoquímico (según punto 4.1.1) fueron fijadas en solución de formalina tamponada al 10% (v/v). Una vez fijadas, se realizaron cortes seriados de 5 µm de espesor, los que fueron montados sobre portaobjetos y sometidos

a tinción con Hematoxilina–Eosina, bajo los protocolos estándares de tinción histológica, para luego ser visualizados con microscopio óptico Olympus FSX100. La evaluación microscópica se centró en los cambios inflamatorios y/o degenerativos presentes en el epitelio de los adenómeros alveolares, epitelio de conductos y estroma glandular, comparando estas observaciones entre las glándulas infectadas y no infectadas, y entre ambos grupos experimentales. Además, mediante *software ImageJ 1.51n* (Dr. Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, USA) se realizó el recuento del número total de células por campo visual, con el objetivo de estimar y comparar en forma cuantitativa el nivel de infiltración celular en las glándulas desafiadas y no desafiadas entre ambos grupos experimentales.

#### 4.1.5. Evaluación clínica post desafío bacteriano

Durante los 2 días posteriores al desafío bacteriano todas las ratonas fueron observadas en forma individual, a modo de detectar diferencias en el cuadro clínico local o sistémico propio de la infección entre ambos grupos experimentales. Las observaciones fueron realizadas a las 20, 30 y 48 horas post desafío, en base a un protocolo adaptado del propuesto por Morton y Griffiths [122] (Anexo 2). En base a la puntuación de cada ratona se obtuvieron los puntajes grupales para cada momento de evaluación.

#### 4.1.6. Análisis estadístico

Los resultados de la bacteriología cualitativa y su asociación con el tratamiento respectivo fueron evaluados mediante prueba de probabilidad exacta de Fisher. Respecto a la bacteriología cuantitativa, los recuentos bacterianos de las glándulas desafiadas y no desafiadas fueron transformados a unidades logarítmicas ( $\log_{10}$  UFC/g) y luego comparados entre grupos experimentales mediante Prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon, con un IC del 95%. Por otra parte, los *scores* del protocolo de evaluación clínica fueron evaluados mediante un modelo lineal generalizado mixto, considerando como efectos fijos el tratamiento (placebo *v/s* vacuna) y el tiempo (20, 30 y 48 horas post infección), mientras las ratonas (individuos) fueron consideradas como efecto aleatorio. Finalmente, el recuento de células totales en el parénquima mamario fue comparado entre grupos experimentales mediante Prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon, con un IC del 95%. Para todos los análisis se utilizó el *software* estadístico *R* versión 3.4.2 (© The R Foundation). Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de  $P < 0,05$ . Los resultados fueron graficados con el *software* GraphPad PRISM® versión 6.01 (GraphPad Software, Inc.).

#### 4.1.7. Normas de bioseguridad

Se utilizaron las normas de bioseguridad recomendadas por los CDC, Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, para un nivel de bioseguridad 2, correspondiente a “*E. coli* productora de Shigatoxina (Verocitotoxina)” [117].

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1. La vacunación en base a proteoliposomas bacterianos disminuyó el recuento bacteriano en las glándulas desafiadas, pero no disminuyó el número de glándulas infectadas

Los resultados del análisis bacteriológico cualitativo y cuantitativo son presentados en la Tabla 4 y Figura 17, respectivamente. Respecto a la bacteriología cualitativa, el número de glándulas positivas al cultivo tras el desafío bacteriano fue 6/6 (100%) en el grupo placebo y 5/7 (71,43%) en el grupo vacunado. Sin embargo, esta reducción en el número de glándulas positivas al cultivo no fue de significancia estadística ( $P = 0,4615$ ; Tabla 4). Cabe destacar que en las ratonas del grupo placebo se detectaron 2/6 un (33,33%) glándulas no desafiadas (inoculadas con PBS estéril) y positivas al cultivo, mientras en el grupo vacunado no se detectaron glándulas no desafiadas y positivas al cultivo, aunque esta diferencia tampoco arrojó significancia estadística ( $P = 0,1923$ ; Tabla 4).

Con relación al análisis bacteriológico cuantitativo, el recuento bacteriano en las glándulas desafiadas del grupo placebo fue de  $7,437 \pm 1,639 \log_{10}$  UFC/g, mientras que en el grupo vacunado se observó un recuento de  $2,018 \pm 1,527 \log_{10}$  UFC/g. Así, en promedio, el recuento bacteriano de las glándulas desafiadas fue 5,419 unidades logarítmicas menor en el grupo vacunado respecto al grupo placebo; esta diferencia entre grupos fue de alta significancia estadística ( $P < 0,0012$ ; Figura 17). Dado que 2 ratonas del grupo placebo presentaron positividad en las glándulas no desafiadas, el recuento bacteriano de estas glándulas fue comparado entre el grupo placebo (promedio =  $1,234 \pm 2,106 \log_{10}$  UFC/g) y el grupo vacunado (sin recuento bacteriano), no detectándose diferencias estadísticas ( $P = 0,1923$ ; Figura 17).

### 4.2.2. La vacunación en base a proteoliposomas bacterianos protegió a las ratonas del cuadro clínico severo tras ser desafiadas experimentalmente

Durante las 48 horas posteriores al desafío bacteriano, las ratonas fueron supervisadas individualmente en base a un protocolo de evaluación clínica adaptado del propuesto por Morton y Griffiths [122] (Anexo 2). Las principales variables de este protocolo se basan en el aspecto general de los animales, alteraciones en el comportamiento espontáneo, características del comportamiento en respuesta a la manipulación, variación en los parámetros respiratorios y signos clínicos a nivel mamario. Los puntajes para cada variable, en función de la magnitud de la alteración observada, fueron de 0 a 3 y, aditivamente, el *score* total de cada ratona pudo variar de 0 (para animales completamente sanos) hasta 15 (para ratonas con cuadro clínico sistémico severo). Como se observa en la Figura 18, los *scores* grupales fueron significativamente menores en las ratonas vacunadas, respecto a las ratonas del grupo placebo, a las 20 ( $P < 0,0001$ ), 30 ( $P = 0,0009$ ) y 48 ( $P = 0,0001$ ) horas post desafío. Las ratonas del grupo vacunado sólo manifestaron enrojecimiento de los pezones, lo cual fue atribuido al traumatismo producto de la inoculación con aguja, y a las 48 horas post desafío sólo 2 ratonas manifestaron signos leves de edema e

inflamación local. Por el contrario, todas las ratonas del grupo placebo mostraron inflamación mamaria moderada a severa a las 20 horas post desafío y 5/6 ratonas mostraron signos sistémicos severos. A las 30 horas post desafío, todas las ratonas del grupo placebo cursaron con signos clínicos sistémicos severos, cuya gravedad aumentó progresivamente hasta las 48 horas post desafío. En efecto, las ratonas del grupo placebo mostraron un *score* significativamente mayor a las 30 ( $P = 0,0368$ ) y 48 ( $P = 0,0298$ ) horas post desafío, respecto a las 20 horas. Estos signos clínicos severos incluyeron inflamación mamaria moderada a marcada, oscurecimiento de la zona ventral, depresión moderada a severa, frecuencia respiratoria elevada y/o ritmo respiratorio asincrónico, pelaje hirsuto, postura cifótica y claudicación.

En el análisis *post mortem* de las ratonas (Figura 19) fue posible asociar la severidad del cuadro clínico a los cambios macroscópicos de las glándulas mamarias desafiadas. Así, en el grupo vacunado sólo se observaron 2 ratonas con cambios patológicos en las glándulas desafiadas, correspondientes a edema y congestión. Por el contrario, todas las ratonas del grupo placebo mostraron cambios macroscópicos evidentes en el tejido mamario, principalmente edema marcado y congestión severa. Además, mientras en 4 ratonas se observó una mayor friabilidad del parénquima mamario desafiado, en las otras 2 ratonas se observó consolidación tisular. Cabe destacar también que en 4 ratonas del grupo placebo se observaron cambios macroscópicos evidentes (edema y congestión) de menor severidad en glándulas no desafiadas (inoculadas con PBS estéril).

#### *4.2.3. La vacuna en base a proteoliposomas bacterianos disminuyó el daño tisular y la infiltración inflamatoria producto del desafío bacteriano*

En la Figura 20 se presentan varias secciones histológicas representativas del ensayo de vacunación y desafío intramamario. El análisis de las glándulas no desafiadas representa en mejor forma las características histológicas de la glándula mamaria murina sana y en lactancia (Figura 20.a y 20.b). La arquitectura lobulillar y alveolar propia de la glándula se observa bien definida, el epitelio mamario se encuentra íntegro y los alveolos contienen secreción exocrina (leche). Además, la presencia de células inflamatorias es escasa y corresponde principalmente a macrófagos. Por otra parte, las glándulas desafiadas pertenecientes a las ratonas vacunadas (Figura 20.c y 20.d) presentaron cambios inflamatorios en un grado leve a moderado. En efecto, estas glándulas mantuvieron su arquitectura histológica intacta, aunque los alveolos y conductos intralobulillares presentaron niveles leves a moderados de infiltración inflamatoria, principalmente neutrófilos y, en menor medida, macrófagos. Finalmente, las glándulas desafiadas pertenecientes a las ratonas del grupo placebo (Figura 20.d y 20.e) mostraron cambios inflamatorios y degenerativos severos, observándose una marcada alteración de la arquitectura glandular, degradación del epitelio mamario e infiltración masiva de células inflamatorias, principalmente

neutrófilos. Estos cambios inflamatorios y degenerativos, aunque en menor magnitud, pudieron también observarse en algunas glándulas no desafiadas del grupo placebo.

Como una forma de expresar cuantitativamente el nivel de infiltración inflamatoria, mediante el *software ImageJ 1.51n* se realizó un recuento automático del número total de células por campo visual en todas las secciones histológicas estudiadas (Figura 21). Para minimizar el sesgo, la cuantificación fue realizada en todas las glándulas mamarias, considerando una fotografía completa y con el mismo nivel de magnificación para cada glándula. En este análisis se observó que el número de células totales fue significativamente mayor ( $P = 0,0025$ ) en las glándulas desafiadas del grupo placebo (promedio =  $13.826 \pm 3.914$  células/campo) respecto a las del grupo vacunado (promedio =  $6.886 \pm 1.872$  células/campo). Finalmente, el recuento celular en las glándulas no desafiadas no mostró diferencias estadísticas ( $P = 0,5253$ ) entre las ratonas del grupo placebo y las ratonas vacunadas.

## VI. DISCUSIÓN

El estudio de la mastitis bovina se ve inherentemente enfrentado a dificultades económicas y de manejo, producto de las características fisiológicas y productivas propias de la vaca lechera. Por esta razón, la descripción inicial de un modelo murino de mastitis clínica por R. L. Chandler en 1970 abrió una nueva perspectiva para el estudio de la fisiología y patología mamaria, permitiendo importantes avances para el estudio de nuevos agentes antimicrobianos, inmunomoduladores y terapia anticancerígena [67], [110]. Sin embargo, el modelo murino también ofrece ciertas limitaciones que deben ser consideradas durante la ejecución de estos estudios. En particular para el estudio de la mastitis, debe considerarse la existencia de especificidad de especie por parte de varias cepas bacterianas, lo cual conlleva a marcadas diferencias en las características clínicas y patológicas del proceso infectivo, como ha sido descrito para *S. aureus* [123] y *E. coli* [35]. Por este motivo, el estudio de la mastitis en el modelo murino debe considerar siempre la estandarización previa del modelo, en función de la bacteria a utilizar en el desafío (cepa y virulencia), características fisiológicas de la ratona (cepa, edad, peso y días en lactancia) y características clínicas deseables de observar. En este estudio, se evaluaron 3 dosis bacterianas para ser inoculadas directamente en glándulas mamarias murinas en lactancia, en base a las escasas experiencias descritas en la literatura [18], [35], [36], [124]. Cabe mencionar que, a pesar de la importancia clínica de *E. coli* en la etiología de la mastitis bovina, la mayoría de los estudios de desafío bacteriano de glándulas mamarias murinas disponibles en la literatura han sido realizados con *S. aureus* [26]–[34], aunque se describen también algunos modelos de mastitis en ratonas inducida por LPS bacteriano [113], [125], [126]. Como resultado de las inoculaciones, las dosis en el rango de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL permitieron replicar un cuadro de mastitis clínica coliforme en todas las glándulas y ratonas inoculadas, con signos clínicos locales y sistémicos evidentes, que permitieron ejecutar un protocolo de supervisión clínico objetivo. Además, los cambios macroscópicos mamarios al examen *post mortem* y el posterior recuento microbiológico (Tabla 1) reflejaron diferencias fácilmente contrastables entre glándulas desafiadas y no desafiadas. En base al criterio de selección establecido en el objetivo 1, por tanto, se eligió trabajar con la dosis de  $10^5$  UFC/mL. Si bien esta dosis de inoculación puede parecer elevada ( $5 \times 10^3$  UFC/glándula), ésta se encuentra dentro de los rangos descritos en la literatura para el modelo murino de mastitis coliforme. Por ejemplo, Notebaert *et al.* [36] inocularon  $10^3$  UFC de *E. coli* en cada glándula desafiada (2 glándulas/ratona), replicando a las 48 horas post desafío sólo un cuadro de mastitis clínica moderada y no en todas las ratonas inoculadas. Además, la necropsia de las ratonas enfermas a las 48 horas evidenció sólo cambios patológicos leves a moderados en el parénquima mamario. Porcherie *et al.* [18] también desafiaron 2 glándulas mamarias por ratona con  $10^3$  UFC de *E. coli* P4, generándose sólo un

cuadro de mastitis clínica leve, sin síntomas severos o muerte de las ratonas dentro de las 48–72 horas post desafío. En otro modelo de estudio (peritonitis coliforme), Chiang *et al.* [127] inocularon ratones por vía intraperitoneal con  $10^5$  UFC totales de la cepa *E. coli* O6:K2:H1, desencadenándose sólo un cuadro de peritonitis leve autolimitada, la cual fue resuelta sin apoyo terapéutico dentro de 72 horas. Por tanto, en base a los resultados obtenidos en la ejecución del objetivo 1, las actividades para el cumplimiento de los objetivos 3 y 4 de este estudio fueron realizadas con una dosis mínima infectante de  $10^5$  UFC/mL (5.000 UFC/50  $\mu$ L/glándula desafiada).

Los liposomas son ampliamente utilizados como sistemas de entrega de drogas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo cual implica concurrentemente una alta potencia y una baja toxicidad [23]. Si bien el primer agente terapéutico basado en liposomas fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en la década de los 90's [128], la habilidad de los liposomas para inducir respuestas inmunes contra antígenos incorporados o asociados fue reportada por primera vez por Allison y Gregoriadis en 1974 [129]. Desde entonces, los liposomas y nanovesículas derivadas de liposomas han llegado a ser importantes sistemas *carriers* y el interés en el desarrollo de vacunas basadas en liposomas ha aumentado considerablemente [24], [25]. Durante la década pasada, Roberts *et al.* [22] describieron el uso directo de proteoliposomas bacterianos como agentes antigénicos e inmunoestimulantes para el desarrollo de una vacuna contra *B. pertusis* en un modelo murino; no obstante, a la fecha no existe en la literatura investigación nueva respecto a este uso. Si bien la formulación de liposomas sintéticos se describe como una técnica de fácil aplicabilidad y escalamiento [25], la formulación de proteoliposomas bacterianos sigue presentando algunos desafíos técnicos, particularmente en términos de bioseguridad, dado que los procesos de sonicación y centrifugación diferencial pueden ser insuficientes para asegurar la ausencia de microorganismos vivos en el producto final. Por esta razón, la esterilidad de la formulación utilizada en este estudio fue corroborada mediante las pautas entregadas por la Farmacopea Europea, antes de ser administradas en los animales en estudio [120].

En términos descriptivos, se demostró que los proteoliposomas formulados en este trabajo fueron capaces de retener proteínas bacterianas con potencial antigénico y moléculas bacterianas inmunoestimulantes, tales como LPS, material genético y restos de pared celular. Mediante la cuantificación de proteínas totales (Tabla 2) y su posterior visualización en SDS–PAGE, se demostró la presencia y diversidad de proteínas de origen bacteriano en las formulaciones. En base a su participación porcentual, destaca una gran banda ubicada entre los 35–45 kDa, la cual da cuenta del 41% del total de proteínas bacterianas retenidas en las 3 formulaciones de proteoliposomas (Figuras 2 y 3). Es ampliamente reconocido que las proteínas de *E. coli* concentradas en este rango molecular corresponden a porinas de membrana externa, tales como OmpC y OmpF, aunque el subtipo de porina y su participación cuantitativa en la membrana

externa dependen de la cepa y las condiciones bioquímicas a las cuales está siendo sometida [130]–[135]. Cabe destacar que este grupo de proteínas es reconocido por su alto poder inmunogénico [135], [136]. Si bien sus funciones se relacionan principalmente con el ingreso de nutrientes y otras moléculas esenciales, se describe su capacidad para hacer resistente a la bacteria a sales biliares, antimicrobianos, enzimas proteolíticas y otros factores hostiles, además de asociarse a mecanismos de evasión de la respuesta inmune y adsorción a células hospederas [137]. En forma interesante, estas proteínas son altamente conservadas dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Por ejemplo, Wang *et al.* [135] describieron para la porina OmpF de la cepa *E. coli* CVCC 1515 un 90–100% de identidad con el 46,7% de las cepas de *E. coli* y 52,8% de las cepas de *Shigella* spp. Cabe mencionar que la presencia de otras proteínas específicas con rol antigénico no fue determinada en los proteoliposomas de este estudio. En un futuro, se requiere la identificación de proteínas específicas, por ejemplo, mediante la separación electroforética de proteínas en geles de 2 dimensiones y posterior identificación mediante *Western Blot* o espectrometría de masas. Sin embargo, el electroferograma demostró una alta homología en el patrón de proteínas totales entre las distintas fracciones bacterianas y subcelulares recolectadas durante el proceso de producción (Figura 3), lo cual permite inferir que el procedimiento resulta mucho más favorable para la mantención del patrimonio antigénico de la bacteria, al ser comparado con las técnicas tradicionales de inactivación, como el tratamiento con formaldehído o calor, los cuales alteran la estructura química de las proteínas, por lo cual limitan el procesamiento y presentación antigénica por parte de CPA y, por lo tanto, su reconocimiento por parte de linfocitos T y la generación de células de memoria [14], [15], [80].

La incorporación de material genético en los proteoliposomas también fue demostrada mediante su cuantificación y visualización en geles de agarosa. La importancia de su incorporación radica en su naturaleza PAMP y, por lo tanto, su demostrado poder inmunoestimulante tras ser reconocidos principalmente por los TLR9 de las células inmunes innatas [63], [64], [138]. Dado que la sonicación empleada para la disgregación de las membranas bacterianas afecta en forma negativa la estructura del DNA [139], [140], parte importante del mismo puede ser perdido con mayor facilidad durante los procesos de solubilización y centrifugación diferencial. En efecto, los geles de agarosa demostraron la presencia de material genético degradado a lo largo de los carriles respectivos. Además, dada la dificultad de cuantificar certeramente el contenido de DNA en una formulación que contiene otras moléculas biológicas que interfieren su lectura, estos resultados deben ser evaluados con discreción. Por una parte, la cuantificación directa tras hervir la muestra de proteoliposomas puede estar fuertemente sobreestimada debido a la presencia de proteínas bacterianas, como fue demostrado con una alta relación 260/280 ( $1,347 \pm 0,042$ ; Tabla 2). En otra arista, la técnica de extracción mediante fenol–cloroformo permite la extracción de material genético más puro, pero conllevando recíprocamente a la pérdida de material

durante el protocolo, por lo cual su cuantificación puede estar subestimada; esta razón pudo explicar la marcada diferencia entre la cuantificación directa *v/s* post extracción ( $1.102,228 \pm 114,727$  nm *v/s*  $39,825 \pm 15,991$  nm, respectivamente; Tabla 2). Cabe destacar la pobre relación 260/280 obtenida con la extracción mediante fenol-cloroformo ( $1,010 \pm 0,019$ ); sin embargo, se describe que esta técnica debe ser realizada varias veces en forma secuencial si desea obtenerse un material genético más puro, a expensas de una menor cuantificación, razón por la cual no se repitió el procedimiento. Con todas estas consideraciones, la cuantificación exacta del material genético total incorporado en las formulaciones de proteoliposomas bacterianos parece ser un desafío pendiente. Finalmente, es interesante destacar lo observado en los geles de agarosa; si bien la sonicación generó una considerable degradación del material genético, una parte importante de este no logró atravesar los poros del gel y fue retenido en los pocillos respectivos (Figura 4.a), lo cual hace inferir que la degradación, aunque demostrada, no fue completa y permitió la retención de fragmentos de longitud considerable en los proteoliposomas. Esto pudo además ser demostrado con la muestra de material genético extraída con el método de fenol-cloroformo, donde puede visualizarse una gran banda difusa de DNA genómico en el rango de los 4.000–5.000 bp, como fue también descrito por Pitcher *et al.* [141] y por Zhang *et al.* [142].

El principal componente de la hoja exterior de la membrana externa de las bacterias Gram negativas es el LPS, uno de los más potentes estimuladores del sistema inmune innato del hospedero, el cual consta de 3 diferentes dominios: (1) el lípido A, más o menos acilado y fosforilado, anclado en la membrana bacteriana externa; (2) el oligosacárido central (*core*) unido al lípido A mediante el ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo); (3) el antígeno-O (polisacárido O-específico) [143]. El reconocimiento del LPS involucra a LBP (proteína de unión a LPS), CD14, MD-2 (proteína de diferenciación mieloides 2) y TLR4, presentes en la membrana de las células inmunes [144], [145]. La dimerización de TLR4 lleva al reclutamiento de MyD88 y otras moléculas adaptadoras, iniciándose una cascada de señalización intracelular que conlleva a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, con la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 [6], [36], [144], [146], [147]. Respecto a los niveles de LPS en los proteoliposomas formulados en este ensayo, se presentaron ciertas dificultades para su cuantificación. La estimación del contenido de LPS mediante Ensayo Purpald fue inicialmente descrita por Quesenberry y Lee [148] y posteriormente perfeccionado por el mismo grupo de estudio [118] y se basa en la oxidación peryódica de grupos glicoles terminales no substituidos en el Kdo de las moléculas de LPS, con la liberación de formaldehído el cual, tras una reacción con Purpald y oxidación con NaIO<sub>4</sub>, es cuantificado a 550 nm. Lamentablemente, es una técnica poco específica y fuertemente interferida por la presencia de otros compuestos presentes en las muestras en estudio, tales como monosacáridos lineales, TRIS, etilenglicol o glicerol [118], [149]. Recientemente, A. Galeev demostró que una correcta y confiable cuantificación del contenido de LPS mediante el Ensayo Purpald requiere un altísimo grado

de pureza, tanto en las muestras a analizar como en los estándares comerciales [150]. En base a esto, es muy probable que el elevado resultado de la cuantificación obtenida en las 3 formulaciones de proteoliposomas se encuentre interferido. Por tanto, de requerirse una cuantificación específica de LPS, debería recurrirse a técnicas de mayor especificidad como la cromatografía de gases–espectrometría de masas, descrita por De Santana–Filho *et al.* [151]. No obstante, en base a los resultados descritos en el objetivo 3, es probable que la incorporación de LPS en las formulaciones de proteoliposomas fuese suficiente para lograr sus efectos inmunoestimulantes, sin la generación de efectos endotóxicos locales o sistémicos en los animales inoculados.

Respecto a la evaluación de parámetros físicos, el equipo Brookhaven *ZetaPlus* es una herramienta de gran utilidad para la caracterización de polímeros y otras partículas, aunque sus resultados siempre deben ser analizados con precaución, particularmente al trabajar con muestras de origen biológico. Así, por ejemplo, mientras el equipo cuantificó un tamaño promedio de partícula de  $352,2 \pm 8,7$  nm, con la medición directa mediante TEM se obtuvo un resultado 3 veces menor ( $105,517 \pm 24,737$  nm). No obstante, la medición mediante TEM debe considerarse de mayor exactitud, dado que permite medir directamente a cada vesícula, descartando el efecto de aglomeración o la medición de detritos u otros contaminantes de la formulación; además, la visualización de los proteoliposomas bajo microscopio permitió demostrar fehacientemente la conformación de las vesículas lipídicas tras la extracción del detergente, así como la inclusión de fragmentos de membrana y pared celular en su interior (Figura 5). Con las mediciones del equipo Brookhaven *ZetaPlus* también pudo demostrarse indirectamente esta afirmación, dado que el tamaño promedio de los proteoliposomas fue significativamente mayor ( $P < 0,0001$ ) respecto a la fracción de membranas bacterianas (previo a la extracción del detergente). La importancia del tamaño de los proteoliposomas radica en la facilidad con la cual son removidos del organismo y con la cual son reconocidas por parte de CPA [24], [86], [152], [153]. Ghaffar *et al.* [23] describieron que liposomas pequeños (20–200 nm) son principalmente fagocitados por células dendríticas, mientras que aquellos mayores a 500 nm son fácilmente fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear y, por lo tanto, removidos con mayor rapidez del organismo. Por el contrario, Carmona–Ribeiro [153] y Schwendener [24] describieron un tamaño cercano a los 500 nm como óptimo para el reconocimiento por parte de células dendríticas. Por otra parte, el tamaño de las vesículas también podría influir sobre el perfil de la respuesta inmune generada. Al respecto, Badiee *et al.* [154] emplearon liposomas de distintos tamaños (100, 400 y 1.000 nm) como adyuvantes para una proteína de *Leishmania* (rgp63), observando sólo producción de IFN- $\gamma$  en esplenocitos y menores relaciones IgG1/IgG2a en el suero de ratones inmunizados con liposomas  $\geq 400$  nm. En forma similar, Mann *et al.* [100] observaron que liposomas pequeños (~250 nm) favorecieron respuestas Th2, mientras que los más grandes (~980 nm) indujeron altos niveles de IFN- $\gamma$  e IgG2 propios de respuestas Th1. Con resultados opuestos,

Henriksen–Lacey *et al.* [101] demostraron que la encapsulación de un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* (Ag85B–ESAT–6) con liposomas catiónicos de tamaños  $\leq 500$  nm indujo una mayor producción de IFN- $\gamma$  en esplenocitos de ratones inoculados y mayor producción de IL-1 $\beta$  en el sitio de inyección, aunque no observaron diferencias en la relación IgG1/IgG2a asociadas al tamaño de partícula. También debe considerarse la influencia del tamaño de vesícula sobre su retención en el sitio de inoculación y dinámicas de drenaje dentro del organismo. Al respecto, Manolova *et al.* [152], mediante el empleo de virosomas fluorescentes, demostraron *in vivo* que vesículas grandes (500–2.000 nm) fueron principalmente asociadas a células dendríticas del sitio de inyección, mientras partículas de menor tamaño (20–200 nm) fueron también localizadas en forma importante en células dendríticas y macrófagos residentes en linfonodos, sugiriendo el drenaje libre de estas partículas hacia los linfonodos y, por lo tanto, su capacidad de activar directamente a células dendríticas periféricas. En otro contexto, el valor de polidispersidad entregado por el equipo Brookhaven *ZetaPlus* para los proteoliposomas ( $0,213 \pm 0,027$ ) se considera moderado para la técnica de dispersión dinámica de luz usada por el equipo y, por lo tanto, puede estimarse que la distribución de los pesos moleculares de las vesículas fue relativamente heterogénea, lo cual se describe con frecuencia en la formulación de liposomas [86], [99], [155].

Probablemente el parámetro de mayor interés entregado por el equipo corresponde al potencial  $\zeta$ , parámetro que permite estimar la carga eléctrica neta de las vesículas [25], [103], [155]. Al respecto, el valor promedio entregado por el equipo para las formulaciones fue de  $-40,33 \pm 1,03$ , siendo este valor significativamente más negativo ( $P < 0,0001$ ) que el estimado para las fracciones de bacterias completas ( $-31,30 \pm 0,46$  mV) y membranas ( $-33,96 \pm 0,97$ ). La mantención de cargas aniónicas en la formulación de proteoliposomas debe considerarse obvia, dado que la carga neta de las membranas bacterianas de las cuales se originaron también es negativa. Sin embargo, este parámetro presenta particular interés en términos biotecnológicos e inmunitarios. Por una parte, está demostrado que los proteoliposomas con carga neta positiva o negativa son mucho más estables respecto a los liposomas no cargados, debido a que las fuerzas de repulsión eléctrica evitan su aglomeración [23], [102]–[104]. Respecto a su rol inmunoestimulante, el empleo de liposomas aniónicos y catiónicos inducen respuestas inmunes antígeno específicas más fuertes respecto a los de carga neutra [25], [98], [105], [156], lo cual podría deberse a su mayor habilidad para interactuar con las membranas celulares, facilitando su unión y encuentro con receptores específicos, así como su fagocitosis por células del sistema inmune [25], [157], [158]. Patil *et al.* [157] demostraron que nanopartículas de óxido de cerio con potencial  $\zeta$  de  $-43$  mV tuvieron una mayor tasa de interacción y posterior ingestión por parte de células de adenocarcinoma pulmonar A549, respecto a nanopartículas con cargas menos negativas y/o cargas positivas. Si bien las superficies celulares también tienen carga neta negativa, los estudios de potencial  $\zeta$  sobre la línea celular A549

demonstraron cargas de  $-10,2 \pm 19,7$  mV. Por tanto, los autores plantean la existencia de sitios catiónicos en las superficies celulares, donde las nanovesículas aniónicas interactuarían en forma de *clusters*.

Los resultados del objetivo 3 demostraron que la vacuna en base a proteoliposomas bacterianos fue segura en la especie de destino y bajo el protocolo empleado. Tras la inmunización subcutánea se observó un leve aumento de volumen a nivel local, el cual desapareció dentro de las 24 horas post inoculación. En base al protocolo de evaluación clínica implementado (Anexo 2), todas las ratonas mantuvieron *score* 0 tras 72 horas post inyección. Además, se demostró que tanto el número de ratonas preñadas al día 25 (20 días post inicio del acoplamiento reproductivo) como el número de crías observado dentro de las 12 horas post parto fue igual entre ambos grupos experimentales (Tabla 3). El análisis de ambos parámetros reproductivos debe considerarse de vital importancia en el desarrollo de vacunas contra la mastitis, dado que los esquemas de vacunación se inician durante el último tercio de gestación, periodo en el cual la ocurrencia de abortos suele conllevar a la eliminación de las hembras bovinas por razones económicas [159], [160]. Estos resultados permiten inferir que el contenido de componentes inmunoestimulantes fue suficiente para inducir una respuesta inmune protectora potente y eficaz (en base a los resultados de los objetivos 3 y 4), sin ocasionar efectos deletéreos en las ratonas. Por otra parte, los resultados de los ELISAs indirectos en muestras de sangre y macerados mamarios demostraron un aumento significativo en los niveles sistémicos y locales de anticuerpos contra *E. coli* ya desde los 21 días post vacunación, siendo la cuantificación aún mayor al día 35 (14 días post refuerzo) (Figuras 9–12). Al evaluar los niveles de anticuerpos específicos contra una cepa heteróloga (*E. coli* ATCC 25922), se observó que el aumento de IgG, IgG1 e IgG2a específicas sólo fue de significancia estadística tras la segunda dosis (Figuras 10 y 11), demostrando la necesidad de aplicar al menos 2 dosis para obtener un efecto inmunogénico potente, lo cual ya ha sido demostrado con otras vacunas contra la mastitis coliforme en bovinos [9], [11], [13]. No obstante, esto también pudo explicarse por la inactivación de la bacteria con fenol antes de ser pegada en las placas de ELISA, alterando la estructura química de los epítomos bacterianos y, en consecuencia, disminuyendo la afinidad de unión con los anticuerpos generados tras la vacunación. Es interesante destacar que los niveles de IgG específica, así como sus isotipos IgG1 e IgG2a, también fueron significativamente mayores en la glándula mamaria (Figura 12), demostrándose que la inmunización parenteral permite la llegada de anticuerpos específicos a la glándula. Tanto a nivel sanguíneo como a nivel mamario, la razón IgG1/IgG2a fue mayor a 1, lo cual permite inferir que el perfil inmunitario inducido por la formulación de proteoliposomas tendió hacia una respuesta principalmente Th2. Este resultado debería considerarse esperable, dada la utilización de hidróxido de aluminio como vehículo, el cual tiende a dirigir las respuestas inmunes de los antígenos a los cuales vehiculiza hacia el perfil Th2, tanto en ratones como en seres humanos [92], [95], [161], [162]. Cabe destacar, sin embargo, que estas razones fueron levemente mayores a 1,5 (1,39–1,65 en sangre y 1,73 en glándula mamaria), lo

cual no puede considerarse elevado. Como posible explicación, puede inferirse que la capacidad de los proteoliposomas formulados para incluir varios factores moleculares de origen bacteriano pudo haber ayudado a “balancear” el perfil inmunitario inducido por la vacuna, dado que los PAMPs activan directamente a las células dendríticas mediante TLRs, lo cual favorece principalmente el desarrollo de respuestas Th1 [146], [163]–[165]. En este contexto, la activación del TLR4 por el LPS bacteriano, el TLR5 por flagelina y el TLR9 por CpG DNA induce fuertes respuestas Th1 a través de la liberación de IL-12p70; así mismo, la estimulación de IFN- $\alpha$  por TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9 es una importante fuerza impulsora de respuestas Th1 mediadas por TLRs [146], [164], [166]–[168]. Al contrario, en las vías de señalización intracelular de las células dendríticas, la ausencia de la molécula adaptadora MyD88 (asociada a la activación de casi todos los TLRs, excepto TLR3) resulta en respuestas orientadas hacia el perfil Th2 [169]. No obstante, se requieren estudios adicionales para corroborar el perfil de la respuesta inmune inducida por los proteoliposomas bacterianos, como la cuantificación diferencial de citoquinas a nivel circulante y mamario, o ensayos de inducción *in vitro* de esplenocitos aislados de ratones inmunizados. Por lo pronto, el alza significativa en los niveles de IgG específica, así como sus isotipos IgG1 e IgG2a, permiten inferir que la vacuna fue lo suficientemente inmunogénica como para generar la opsonización de antígenos (función principalmente atribuida al isotipo IgG2a) así como la neutralización de toxinas y otros compuestos bacterianos (atribuida principalmente al isotipo IgG1), permitiendo un rápido y eficiente reclutamiento de neutrófilos en el sitio de infección, así como el rápido *clearance* bacteriano desde la glándula mamaria, previniendo los efectos clínicos en las ratonas vacunadas (como se demostró en el objetivo 4). En un futuro, junto con la mayor investigación del perfil dicotómico Th1/Th2, también debe evaluarse la participación de la vía Th17 en la protección obtenida con esta vacuna, dada la importancia de los neutrófilos como la principal célula efectora en el control de la mastitis [7], [18], [20], [21]. Es importante mencionar que los niveles de IgA específica a nivel mamario no fueron estadísticamente diferentes en las glándulas desafiadas ( $P = 0,0513$ ) y no desafiadas ( $P = 0,7984$ ) entre ambos grupos experimentales. Estos resultados no son extraños, dado que la mayoría de los estudios en ratones sólo han logrado inducir un aumento local en los niveles de IgA específica tras la inmunización por la misma vía mucosal [27], [30], [34]. Dentro de los estudios disponibles, destaca el realizado por Castagliuolo *et al.* [30] en un modelo murino de mastitis por *S. aureus*, quienes aplicaron por vía intranasal 2 dosis, separadas por 14 días, de una vacuna de DNA en base a 4 adhesinas de *S. aureus*. Estos autores sacrificaron a las ratonas 48 horas post desafío bacteriano, detectando un aumento significativo en los niveles de IgA específica a nivel sérico ( $P < 0,01$ ), así como también en lavados intestinales ( $P < 0,01$ ), vaginales ( $P < 0,01$ ) y saliva ( $P < 0,05$ ). En la especie bovina, la información disponible sobre los niveles de IgA específica inducidos tras protocolos de vacunación también es escasa, dado que la principal inmunoglobulina relacionada con la inmunidad mucosal en rumiantes es IgG1

[170] y los niveles de IgA en la leche y el calostro suelen ser bajos respecto a los niveles de IgG [171]. Así, por ejemplo, Boerhout *et al.* [172] inmunizaron vacas Holstein con una vacuna en base a 2 proteínas recombinantes de *S. aureus*, formuladas con un adyuvante aceite en agua, administrando 2 dosis separadas por 6 semanas y evaluando varias rutas de administración (intranasal, subcutánea, intramuscular e intramamaria). Sólo la ruta subcutánea fue capaz de generar un aumento significativo y consistente en los niveles de IgG1 e IgG2 en sangre y leche (10–20 veces mayores, según el antígeno). Sin embargo, ninguna de las rutas evaluadas logro aumentar los niveles de IgA específica en sangre, leche, secreción nasal ni saliva. A pesar de estos antecedentes, los resultados de la cuantificación de IgA específica en este ensayo son de valioso interés, dado que permiten confirmar que no sería necesario inducir la secreción de IgA específica para lograr un efecto inmunoprotector a nivel mamario y, por lo tanto, su participación en los mecanismos inmunitarios de la glándula mamaria sería más bien limitada.

En otro contexto, también resultan interesantes los resultados obtenidos con la cuantificación de anticuerpos totales a nivel mamario mediante inmunohistoquímica, no observándose diferencias en el nivel total de inmunoglobulinas asociadas a la inmunización o al desafío bacteriano (Figuras 13–16). Este resultado podría resultar contradictorio al ser comparado con el marcado aumento en los niveles de anticuerpos específicos contra *E. coli*. Aun así, debe considerarse que la literatura sólo describe la llegada masiva de anticuerpos a la glándula mamaria y la leche durante la calostrogénesis y, en mucha menor medida, durante su inflamación [20], [52]. Es esperable, por lo tanto, que la vacunación en sí no sea asociada a un aumento en el paso de inmunoglobulinas totales al parénquima mamario. Sin embargo, la literatura si describe la extravasación de proteínas sanguíneas (entre ellas inmunoglobulinas) a los alveolos mamarios durante los procesos inflamatorios, debido a la disrupción de la barrera hemato-láctea [173], [174]. La no visualización de este fenómeno, no obstante, podría ser explicada por 2 razones. Por una parte, Sordillo *et al.* [175] observaron que los niveles de IgG total a nivel local fueron menores en las glándulas mamarias de vacas infectadas, respecto a vacas sanas, durante gran parte del periodo seco, observándose cambios en estos niveles sólo durante el post parto, atribuyéndolo a la coincidencia con la calostrogenesis. En el mismo contexto, Butler y Kehrlí [176] describieron que durante los fenómenos inflamatorios el pasaje de anticuerpos hacia los alveolos mamarios por la vía paracelular sería más bien limitado, siendo explicado fundamentalmente por una pérdida severa de la barrera hemato-láctea. Por lo tanto, en base a la información expuesta, el aumento en los niveles de anticuerpos totales a nivel mamario durante los procesos inflamatorios no siempre sería un fenómeno cuantitativamente grosero y dependería fuertemente del grado de inflamación alcanzado. Por otra parte, en las secciones de glándulas inmunoteñidas en este estudio, el precipitado marrón del DAB se detectó principalmente en el tejido intersticial inter e intralobulillar, siendo mucha menor su ubicación al interior de los alveolos mamarios. No obstante, dado que el procesamiento de las muestras y posteriores cortes histológicos conlleva a cierta

pérdida del contenido intraalveolar [177], [178], es probable que parte de la porción cuantificable de anticuerpos totales haya sido perdida. Con los antecedentes mencionados, la sensibilidad de la técnica de inmunohistoquímica para la cuantificación de anticuerpos totales a nivel mamario sería cuestionable.

Los resultados del último objetivo de este estudio permitieron demostrar que la administración de la vacuna en base a proteoliposomas bacterianos fue eficaz para disminuir el recuento bacteriano y el daño tisular en las glándulas desafiadas, así como prevenir la ocurrencia de un cuadro clínico severo. Si bien la vacuna no logró disminuir en forma significativa el número de glándulas positivas al cultivo (Tabla 4), una disminución del 28,57% en el porcentaje de positividad no debe ser considerado menor, dada la magnitud de la dosis mínima infectante empleada. Es probable que la importancia de este resultado sea apreciada en forma más objetiva empleando un mayor número de ratonas para cada grupo experimental. Por lo tanto, dado que el principal objetivo de la vacunación finalmente es disminuir la incidencia y el recuento bacteriano a nivel mamario, el cálculo de los tamaños muestrales debería ser realizado en función de los resultados bacteriológicos y no en función de los niveles de anticuerpos detectados mediante ELISA indirecto, como se hizo en este estudio. Respecto a los resultados de la bacteriología cuantitativa, el recuento bacteriano promedio de las glándulas mamarias desafiadas en el grupo vacunado fue 5,419 unidades logarítmicas menor respecto al recuento del grupo placebo, siendo una disminución de gran magnitud considerando su expresión en base logarítmica y la alta significancia estadística observada ( $P = 0,0012$ ; Figura 17). En la literatura no es posible encontrar estudios similares en modelo murino donde se compare el efecto de una vacuna, u otra medida profiláctica, frente al desafío experimental con *E. coli*, por lo cual un nuevo ensayo comparativo considerando un control positivo de vacunación, como la bacterina Enviracor® J-5 (Zoetis), sería de gran interés. De cualquier forma, ninguno de los ensayos publicados a la fecha con modelos murinos de mastitis clínica por *S. aureus* [26]–[33] han logrado disminuir los recuentos bacterianos en forma tan significativa, razón por la cual, aunque se trate de otro patógeno, la vacuna evaluada en este estudio debe ser considerada de alta eficacia para la dosis y modelo experimental empleados. En forma adicional, la evaluación clínica de las ratonas tras el desafío bacteriano aportó valiosa información sobre la eficacia de la vacuna. En efecto, los *scores* clínicos grupales fueron significativamente menores en las ratonas vacunadas, respecto a las ratonas del grupo placebo, a las 20 ( $P < 0,0001$ ), 30 ( $P = 0,0009$ ) y 48 ( $P = 0,0001$ ) horas post desafío (Figura 18). Estos resultados también deben considerarse de gran valor, dado que a la fecha no existen ensayos de vacunación en el modelo murino que evalúen en forma objetiva y cuantitativa la evolución clínica de las ratonas desafiadas, limitándose a la entrega de resultados descriptivos [26]–[33]. Además, fue posible asociar los *scores* clínicos grupales con los resultados del análisis *post mortem* e histopatológico. En efecto, las glándulas desafiadas de las ratonas del grupo placebo mostraron cambios severos a nivel macroscópico (congestión y edema marcados, mayor friabilidad o consolidación tisular; Figura 19) y

microscópico (pérdida de la arquitectura glandular, degradación del epitelio mamario e infiltración masiva de células inflamatorias, principalmente neutrófilos; Figura 20), los cuales se presentaron en una magnitud mucho menor en las glándulas del grupo vacunado (Figuras 19 y 20). Finalmente, el número de células totales en el parénquima mamario desafiado fue significativamente menor ( $P = 0,0025$ ; Figura 21) en las ratonas vacunadas (promedio =  $6.886 \pm 1,872$  células/campo) respecto al grupo placebo (promedio =  $13.826 \pm 3.914$  células/campo). El recuento de células inflamatorias en cortes histológicos de glándula mamaria ya fue descrito por Brouillete *et al.* [112] quienes, mediante tinción con naranja de acridina y microscopía de fluorescencia, pudieron discriminar fácilmente los neutrófilos de las células epiteliales en el parénquima mamario de ratonas desafiadas con *S. aureus*, permitiendo su cuantificación diferencial. Dado que los autores describieron la presencia de células epiteliales como un factor relativamente constante, la magnitud de la infiltración de neutrófilos debida a la infección experimental podría ser indirectamente estimada mediante la cuantificación de células totales. La ventaja de esta aproximación radica en la posibilidad de expresar el grado de inflamación en forma cuantitativa y, por lo tanto, realizar una comparación objetiva entre ambos grupos experimentales. Convenientemente, el uso del *software ImageJ 1.51n* permitió realizar la cuantificación celular en forma automática, mediante la deconvolución de colores y posterior recuento del número de núcleos celulares. Si bien esta estimación es indirecta, parece ser una primera aproximación útil y rápida para expresar cuantitativamente el nivel de infiltración celular en los parénquimas tisulares inflamados.

Finalmente, cabe mencionar que este trabajo sólo se enfocó en la evaluación de la eficacia de la vacuna y su asociación con la respuesta inmune humoral montada por las ratonas vacunadas, dejando de lado el análisis del rol de la respuesta inmune celular asociada a la vacunación, lo cual debería ser evaluado en un futuro. En base a los resultados obtenidos, es posible inferir que el marcado aumento en los niveles de anticuerpos específicos contra *E. coli* permitió un reclutamiento rápido y temprano de neutrófilos altamente eficientes al sitio de infección, capaces de fagocitar y destruir eficazmente las bacterias inoculadas, evitando así la multiplicación excesiva del patógeno y la infiltración masiva de células inflamatorias, con las consecuencias clínicas y tisulares que ello implica. Además, el aumento en los niveles de anticuerpos específicos permitió neutralizar a las bacterias invasoras y sus toxinas, evitando su adherencia al epitelio mamario, su multiplicación en la leche y, así mismo, el daño directo ejercido por *E. coli* y sus compuestos sobre el epitelio mamario.

## VII. CONCLUSIONES

1. Se estimó una dosis mínima infectante de  $10^5$  UFC/mL ( $10^3$  UFC/glándula) para el establecimiento de un modelo experimental de mastitis clínica con la cepa de campo *E. coli* RM5278 en ratonas BALB/c. La dosis empleada permitió infectar el 100% de las glándulas desafiadas, con cambios macroscópicos evidentes en el tejido mamario y recuentos bacterianos del orden de  $10^7$  UFC/gramo.
2. Los proteoliposomas formulados fueron capaces de retener diversos factores moleculares de origen bacteriano, incluyendo proteínas de membrana, material genético y LPS. Así mismo, el patrón electroforético de proteínas totales fue de alta homología entre las distintas fracciones recolectadas durante el proceso productivo, infiriéndose la conservación del patrimonio antigénico bacteriano. Los proteoliposomas se conformaron como vesículas lipídicas de tamaño pequeño y carga neta aniónica, con un tamaño promedio de  $105,517 \pm 24,737$  nm y un potencial  $\zeta$  de  $-40,33 \pm 1,03$  mV.
3. La inmunización con una vacuna en base a proteoliposomas de *E. coli* fue segura en ratonas BALB/c, no observándose signos clínicos locales o sistémicos tras la vacunación, así como tampoco la alteración de parámetros reproductivos. La vacuna demostró un alto poder inmunoestimulante en las ratonas vacunadas, observándose un significativo aumento en los niveles sanguíneos de IgG, IgG1 e IgG2a específicas tras el *booster* ( $P < 0,0001$ ; para los 3 isotipos). Además, se detectó un significativo aumento en los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a específicas a nivel mamario ( $P = 0,0012$ ; para los 3 isotipos). Sin embargo, a nivel mamario no se detectaron cambios significativos en los niveles de IgA específica ni en los niveles de inmunoglobulinas totales. Se calculó una relación IgG1/IgG2a de 1,65 a nivel circulante y de 1,73 a nivel mamario, lo cual permite inferir el establecimiento de un perfil inmunitario relativamente balanceado, aunque preferentemente Th2.
4. La inmunización con una vacuna en base a proteoliposomas de *E. coli* fue altamente eficaz en un modelo de mastitis clínica coliforme en ratonas BALB/c, observándose, en promedio, un recuento bacteriano 5,419 unidades logarítmicas menor en las glándulas mamarias de las ratonas inmunizadas ( $P = 0,0012$ ), respecto a las ratonas no vacunadas, aunque no se detectaron diferencias significativas en la incidencia de infección entre ambos grupos. La vacunación también previno el establecimiento de un cuadro clínico severo, observándose un *score* clínico significativamente menor en las ratonas inmunizadas, entre las 20–48 horas post desafío bacteriano ( $P \leq 0,0009$ ). Finalmente, las ratonas inmunizadas también mostraron una menor severidad en las alteraciones histopatológicas del parénquima mamario, observándose un nivel de infiltración inflamatoria significativamente menor ( $P = 0,0025$ ), respecto a las ratonas no vacunadas.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.-M. Heikkilä, J. I. Nousiainen, and S. Pyörälä, “Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling,” *J. Dairy Sci.*, vol. 95, no. 1, pp. 139–150, 2012.
- [2] F. J. S. van Soest, I. M. G. A. Santman-Berends, T. J. G. M. Lam, and H. Hogeveen, “Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms,” *J. Dairy Sci.*, vol. 99, no. 10, pp. 8365–8374, 2016.
- [3] A. M. Getaneh, S. A. Mekonnen, and H. Hogeveen, “Stochastic bio-economic modeling of mastitis in Ethiopian dairy farms,” *Prev. Vet. Med.*, vol. 138, pp. 94–103, 2017.
- [4] H. Hogeveen *et al.*, “Current status and future challenges in mastitis research,” *NMC Annu. Meet. Proc.*, pp. 36–48, 2011.
- [5] U. Geary, N. Lopez-Villalobos, B. O’Brien, D. J. Garrick, and L. Shalloo, “Examining the impact of mastitis on the profitability of the Irish dairy industry,” *Irish J. Agric. Food Res.*, vol. 52, pp. 135–149, 2013.
- [6] D. Hoeben *et al.*, “Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows,” *J. Dairy Res.*, vol. 67, no. 4, pp. 503–514, Nov. 2000.
- [7] C. Burvenich *et al.*, “Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period,” *J. Dairy Sci.*, vol. 90, pp. E39–E54, Apr. 2007.
- [8] Y. Fu *et al.*, “*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 155, no. 4, pp. 245–252, 2013.
- [9] V. Herry *et al.*, “Local immunization impacts the response of dairy cows to *Escherichia coli* mastitis,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–18, 2017.
- [10] J. Hogan and K. L. Smith, “Coliform mastitis,” *Vet. Res.*, vol. 34, pp. 507–519, 2003.
- [11] D. J. Wilson, B. A. Mallard, J. L. Burton, Y. H. Schukken, and Y. T. Gröhn, “Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary *Escherichia coli* challenge for J5 vaccine and control cows,” *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 14, no. 6, pp. 693–699, 2007.
- [12] A. A. Gurjar, S. Klaessig, S. A. Salmon, R. J. Yancey, and Y. H. Schukken, “Evaluation of an alternative dosing regimen of a J-5 mastitis vaccine against intramammary *Escherichia coli* challenge in nonlactating late-gestation dairy cows,” *J. Dairy Sci.*, vol. 96, no. 8, pp. 5053–5063, 2013.
- [13] A. J. Bradley, J. E. Breen, B. Payne, V. White, and M. J. Green, “An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom,” *J. Dairy Sci.*, vol. 98, no. 3, pp. 1706–1720, 2015.
- [14] Y. Furuya, M. Regner, M. Lobigs, A. Koskinen, A. Müllbacher, and M. Alsharifi, “Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole ‘killed’ influenza A viruses and commercial vaccine preparations,” *J. Gen. Virol.*, vol. 91, no. 6, pp. 1450–1460, 2010.
- [15] T. C. Kon *et al.*, “Influenza vaccine manufacturing: effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes,” *PLoS One*, vol. 11, no.

- 3, pp. 1–19, 2016.
- [16] H. Dosogne, F. Vangroenweghe, and C. Burvenich, “Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis,” *Vet. Res.*, vol. 33, pp. 1–12, 2002.
  - [17] S. Elazar, E. Gonen, A. Livneh-Kol, I. Rosenshine, and N. Y. Shpigel, “Essential role of neutrophils but not mammary alveolar macrophages in a murine model of acute *Escherichia coli* mastitis,” *Vet. Res.*, vol. 41, no. 4, 2010.
  - [18] A. Porcherie *et al.*, “IL-17A is an important effector of the immune response of the mammary gland to *Escherichia coli* infection,” *J. Immunol.*, vol. 196, no. 2, pp. 803–812, 2016.
  - [19] M. J. Paape, D. D. Bannerman, X. Zhao, and J.-W. Lee, “The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk,” *Vet. Res.*, vol. 34, pp. 597–627, 2003.
  - [20] L. M. Sordillo, “Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility,” *Livest. Prod. Sci.*, vol. 98, no. 1–2, pp. 89–99, 2005.
  - [21] S. E. Blum, E. D. Heller, S. Jacoby, O. Krifucks, and G. Leitner, “Comparison of the immune responses associated with experimental bovine mastitis caused by different strains of *Escherichia coli*,” *J. Dairy Res.*, vol. 84, no. 2, pp. 190–197, 2017.
  - [22] R. Roberts *et al.*, “Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis,” *Vaccine*, vol. 26, no. 36, pp. 4639–4646, 2008.
  - [23] K. Ghaffar, A. Giddam, M. Zaman, M. Skwarczynski, and I. Toth, “Liposomes as nanovaccine delivery systems,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 14, no. 9, pp. 1194–1208, 2014.
  - [24] R. A. Schwendener, “Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances,” *Ther. Adv. Vaccines*, vol. 2, no. 6, pp. 159–182, 2014.
  - [25] E. Kastner, S. T. Schmidt, A. Wilkinson, D. Christensen, and Y. Perrie, “The application of liposomes as vaccine adjuvants,” in *Subunit vaccine delivery, advances in delivery science and technology*, 1th ed., C. Foged, Ed. New York: Springer Science + Business Media, 2015, pp. 77–94.
  - [26] W. Mamo *et al.*, “Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*,” *Vaccine*, vol. 12, no. 11, pp. 988–992, 1994.
  - [27] M. I. Gómez, V. E. García, M. M. Gherardi, M. C. Cerquetti, and D. O. Sordelli, “Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus* protects mice from experimental mastitis,” *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 20, no. 1, pp. 21–27, 1998.
  - [28] M. S. Diarra *et al.*, “Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* Mastitis: lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 95, no. 1–2, pp. 33–42, 2003.
  - [29] E. Brouillette, G. Grondin, C. Lefebvre, B. G. Talbot, and F. Malouin, “Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*,” *Vet. Microbiol.*, vol. 101, no. 4, pp. 253–262, 2004.
  - [30] I. Castagliuolo *et al.*, “Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice,” *Vaccine*, vol. 24, no. 20, pp. 4393–4402, 2006.
  - [31] R. Gong *et al.*, “Evaluation of clumping factor a binding region a in a subunit vaccine against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice,” *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 17, no. 11, pp. 1746–1752, 2010.

- [32] G. Leitner, O. Krifucks, A. Glickman, A. Younis, and A. Saran, "Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis: Virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 35, no. 2, pp. 99–106, 2003.
- [33] H. Xu *et al.*, "Evaluation of a novel chimeric B cell epitope-based vaccine against mastitis induced by either Streptococcus agalactiae or Staphylococcus aureus in mice," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 18, no. 6, pp. 893–900, 2011.
- [34] V. García *et al.*, "Intramammary immunization with live-attenuated Staphylococcus aureus: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 14, no. 1, pp. 45–51, 1996.
- [35] E. Gonen *et al.*, "Toll-like receptor 4 is needed to restrict the invasion of Escherichia coli P4 into mammary gland epithelial cells in a murine model of acute mastitis," *Cell. Microbiol.*, vol. 9, no. 12, pp. 2826–2838, 2007.
- [36] S. Notebaert, D. Demon, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, and E. Meyer, "Inflammatory mediators in Escherichia coli-induced mastitis in mice," *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 31, no. 6, pp. 551–565, 2008.
- [37] A. J. Bradley, "Bovine mastitis: An evolving disease," *Vet. J.*, vol. 164, no. 2, pp. 116–128, 2002.
- [38] L. K. Fox, "Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis," *Vet. Microbiol.*, vol. 134, no. 1–2, pp. 82–88, 2009.
- [39] C. Hagnestam-Nielsen and S. Stergaard, "Economic impact of clinical mastitis in a dairy herd assessed by stochastic simulation using different methods to model yield losses," *Animal*, vol. 3, no. 2, pp. 315–328, 2009.
- [40] H. Hogeveen, K. Huijps, and T. J. Lam, "Economic aspects of mastitis : new developments," *N. Z. Vet. J.*, vol. 59, no. 1, pp. 15–23, 2011.
- [41] E. Cha *et al.*, "The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming," *J. Dairy Sci.*, vol. 94, no. 9, pp. 4476–4487, 2011.
- [42] S. P. Oliver, B. E. Gillespie, S. Headrick, M. J. Lewis, and H. H. Dowlen, "Heifer mastitis: risk factors and control strategies," *NMC Annu. Meet. Proc.*, pp. 83–99, 2004.
- [43] A. Reyes-Jara, N. Cordero, J. Aguirre, M. Troncoso, and G. Figueroa, "Antibacterial effect of copper on microorganisms isolated from bovine mastitis," *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. 626, 2016.
- [44] A. Pitkälä, M. Haveri, S. Pyörälä, V. Myllys, and T. Honkanen-Buzalski, "Bovine mastitis in Finland 2001 - prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance," *J. Dairy Sci.*, vol. 87, no. 8, pp. 2433–2441, Apr. 2004.
- [45] W. Steeneveld, H. Hogeveen, H. W. Barkema, J. van den Broek, and R. B. M. Huirne, "The influence of cow factors on the incidence of clinical mastitis in dairy cows," *J. Dairy Sci.*, vol. 91, no. 4, pp. 1391–1402, Apr. 2008.
- [46] D. A. Todhunter, K. L. Smith, J. S. Hogan, and P. S. Schoenberger, "Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 52, no. 2, pp. 184–188, Feb. 1991.
- [47] C. Burvenich, V. Van Merris, J. Mehrzad, A. Diez-Fraile, and L. Duchateau, "Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors," *Vet. Res.*, vol. 34, pp. 521–564, 2003.
- [48] B. San Martín *et al.*, "Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X<sup>a</sup> Región, Chile," *Archivos de medicina*

- veterinaria*, vol. 34. pp. 221–234, 2002.
- [49] N. Y. Shpigel, S. Elazar, and I. Rosenshine, “Mammary pathogenic *Escherichia coli*,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 11, no. 1, pp. 60–65, 2008.
- [50] J. R. Wenz, G. M. Barrington, F. B. Garry, R. P. Ellis, and R. J. Magnuson, “*Escherichia coli* Isolates’ Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity,” *J. Dairy Sci.*, vol. 89, no. 9, pp. 3408–3412, 2006.
- [51] A. Leimbach, A. Poehlein, J. Vollmers, D. Görlich, R. Daniel, and U. Dobrindt, “No evidence for a bovine mastitis *Escherichia coli* pathotype,” *BMC Genomics*, vol. 18, no. 1, pp. 1–22, 2017.
- [52] L. M. Sordillo and K. L. Streicher, “Mammary gland immunity and mastitis susceptibility,” *Jounfal Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 7, no. 2, pp. 135–46, 2002.
- [53] C. Riollet, P. Rainard, and B. Poutrel, “Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection,” *J. Dairy Sci.*, vol. 84, no. 5, pp. 1077–1084, 2001.
- [54] X. Zhao and P. Lacasse, “Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control,” *J. Anim. Sci.*, vol. 86, no. 13 Suppl, pp. 57–65, 2008.
- [55] J. Günther *et al.*, “Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–14, 2017.
- [56] J. Mehrzad, C. Desrosiers, K. Lauzon, G. Robitaille, X. Zhao, and P. Lacasse, “Proteases involved in mammary tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows,” *J. Dairy Sci.*, vol. 88, no. 1, pp. 211–222, 2005.
- [57] H. Dosogne, A. V. Capuco, M. J. Paape, E. Roets, C. Burvenich, and B. Fenwick, “Reduction of acyloxyacyl hydrolase activity in circulating neutrophils from cows after parturition,” *J. Dairy Sci.*, vol. 81, no. 3, pp. 672–677, 1998.
- [58] S. Aditya, E. Humer, P. Pourazad, R. Khiaosa-Ard, J. Huber, and Q. Zebeli, “Intramammary infusion of *Escherichia coli* lipopolysaccharide negatively affects feed intake, chewing, and clinical variables, but some effects are stronger in cows experiencing subacute rumen acidosis,” *J. Dairy Sci.*, vol. 100, no. 2, pp. 1363–1377, Feb. 2017.
- [59] L. M. Sordillo, G. M. Pighetti, and M. R. Davis, “Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- $\alpha$  during the periparturient period,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 49, no. 3, pp. 263–270, Dec. 1995.
- [60] O. Wellnitz and R. M. Bruckmaier, “The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection,” *Vet. J.*, vol. 192, no. 2, pp. 148–152, 2012.
- [61] M. Schnare, G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov, “Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses,” *Nat. Immunol.*, vol. 2, p. 947, Sep. 2001.
- [62] H. Karasuyama, T. Wada, S. Yoshikawa, and K. Obata, “Emerging roles of basophils in protective immunity against parasites,” *Trends Immunol.*, vol. 32, no. 3, pp. 125–30, Mar. 2011.
- [63] O. Takeuchi and S. Akira, “Pattern Recognition Receptors and Inflammation,” *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 805–820, 2010.
- [64] J. Pohar *et al.*, “Selectivity of Human TLR9 for Double CpG Motifs and Implications for the Recognition of Genomic DNA,” *J. Immunol.*, vol. 198, no. 5, pp. 2093–2104, 2017.
- [65] S. De Schepper, A. De Ketelaere, D. D. Bannerman, M. J. Paape, L. Peelman, and C. Burvenich,

- “The Toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle,” *Vet. Res.*, vol. 39, no. 05, 2008.
- [66] D. D. Bannerman, “Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows,” *J. Anim. Sci.*, vol. 87, no. 13 Suppl, pp. 10–25, 2009.
- [67] S. Notebaert and E. Meyer, “Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review,” *Vet. Q.*, vol. 28, no. 1, pp. 2–13, 2006.
- [68] B. A. Mallard *et al.*, “Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health,” *J. Dairy Sci.*, vol. 81, no. 2, pp. 585–595, Feb. 1998.
- [69] S. L. Aitken, C. M. Corl, and L. M. Sordillo, “Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 16, no. 4, pp. 291–304, 2011.
- [70] M. Zawrotniak and M. Rapala-Kozik, “Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications,” *Acta Biochim. Pol.*, vol. 60, no. 3, pp. 277–284, 2013.
- [71] J. Oviedo-Boyso *et al.*, “Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis,” *J. Infect.*, vol. 54, no. 4, pp. 399–409, 2007.
- [72] Y. H. Park *et al.*, “Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows,” *J. Vet. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 29–39, 2004.
- [73] K. A. Shafer-Weaver, C. M. Corl, and L. M. Sordillo, “Shifts in bovine CD4<sup>+</sup> subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period,” *J. Dairy Sci.*, vol. 82, no. 8, pp. 1696–1706, Apr. 1999.
- [74] K. A. Shafer-Weaver and L. M. Sordillo, “Bovine CD8<sup>+</sup> suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 56, no. 1–2, pp. 53–64, May 1997.
- [75] H. Korhonen, P. Marnila, and H. S. Gill, “Milk immunoglobulins and complement factors,” *Br. J. Nutr.*, vol. 84, no. S1, pp. S75–S80, 2000.
- [76] R. S. Kallerup and C. Foged, “Classification of vaccines,” in *Subunit vaccine delivery, advances in delivery science and technology*, 1th ed., C. Foged, Ed. New York: Springer Science + Business Media, 2015, pp. 15–29.
- [77] M. Campos and D. L. Godson, “The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune responses,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 33, no. 5–6, pp. 655–661, 2003.
- [78] S. H. E. Kaufmann, “The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 7, pp. 491–504, 2007.
- [79] P. M. H. Heegaard *et al.*, “Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments,” *Arch. Virol.*, vol. 156, no. 2, pp. 183–202, 2011.
- [80] A. Di Tommaso, M. T. De Magistris, M. Bugnoli, I. Marsili, R. Rappuoli, and S. Abrignani, “Formaldehyde treatment of proteins can constrain presentation to T cells by limiting antigen processing,” *Infect. Immun.*, vol. 62, no. 5, pp. 1830–1834, 1994.
- [81] D. B. Huang, J. J. Wu, and S. K. Tying, “A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines,” *J. Infect.*, vol. 49, no. 3, pp. 179–209, 2004.

- [82] H. L. Robinson and R. R. Amara, "T cell vaccines for microbial infections.," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 4 Suppl, pp. S25-32, Apr. 2005.
- [83] T. J. Moyer, A. C. Zmolek, and D. J. Irvine, "Beyond antigens and adjuvants: Formulating future vaccines," *J. Clin. Invest.*, vol. 126, no. 3, pp. 799–808, 2016.
- [84] N. Garçon, G. Leroux-Roels, and W. F. Cheng, "Vaccine adjuvants," *Perspect. Vaccinol.*, vol. 1, no. 1, pp. 89–113, 2011.
- [85] J. C. Aguilar and E. G. Rodríguez, "Vaccine adjuvants revisited," *Vaccine*, vol. 25, no. 19, pp. 3752–3762, 2007.
- [86] R. R. Shah, D. T. O'Hagan, M. M. Amiji, and L. A. Brito, "The impact of size on particulate vaccine adjuvants," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 17, pp. 2671–2681, 2014.
- [87] N. Petrovsky and J. C. Aguilar, "Vaccine adjuvants: current state and future trends," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 82, pp. 488–496, 2004.
- [88] M. Singh and D. T. O'Hagan, "Recent advances in vaccine adjuvants," *Pharm. Res.*, vol. 19, no. 6, pp. 715–728, 2002.
- [89] D. T. O'Hagan and N. M. Valiante, "Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 9, pp. 727–735, 2003.
- [90] R. L. Coffman, A. Sher, and R. A. Seder, "Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work," *Immunity*, vol. 33, no. 4, pp. 492–503, 2010.
- [91] A. Pasquale, S. Preiss, F. Silva, and N. Garçon, "Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond," *Vaccines*, vol. 3, no. 2, pp. 320–343, 2015.
- [92] M. Kool and B. N. Lambrecht, "Mechanism of adjuvanticity of aluminum-containing formulas," in *Molecular vaccines, volume 2*, Springer I., M. Giese, Ed. Cham, Suiza, Suiza, 2014, pp. 663–642.
- [93] C. Exley, P. Siesjo, and H. Eriksson, "The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work?," *Trends Immunol.*, vol. 31, no. 3, pp. 103–109, Mar. 2010.
- [94] M. Kool *et al.*, "Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 4, pp. 869–882, 2008.
- [95] M. Kool, H. Hammad, and B. Lambrecht, "Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity," *F1000 Biol. Rep.*, vol. 4, no. 6, 2012.
- [96] E. Oleszycka and E. C. Lavelle, "Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 28, pp. 1–5, Jun. 2014.
- [97] D. Siel *et al.*, "The immune profile induced is crucial to determine the effects of immunocastration over gonadal function, fertility, and GnRH-I expression," *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 79, no. 1, 2018.
- [98] M. Henriksen-Lacey, K. S. Korsholm, P. Andersen, Y. Perrie, and D. Christensen, "Liposomal vaccine delivery systems," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, no. 4, pp. 505–519, 2011.
- [99] P. N. Pusey, E. Zaccarelli, C. Valeriani, E. Sanz, W. C. K. Poon, and M. E. Cates, "Hard spheres: crystallization and glass formation," *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 367, no. 1909, pp. 4993–5011, 2009.
- [100] J. F. S. Mann, E. Shakir, K. C. Carter, A. B. Mullen, J. Alexander, and V. A. Ferro, "Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection," *Vaccine*, vol. 27, no. 27, pp. 3643–3649, 2009.

- [101] M. Henriksen-Lacey, A. Devitt, and Y. Perrie, "The vesicle size of DDA:TDB liposomal adjuvants plays a role in the cell-mediated immune response but has no significant effect on antibody production," *J. Control. Release*, vol. 154, no. 2, pp. 131–137, 2011.
- [102] M. F. Bachmann and G. T. Jennings, "Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 11, pp. 787–796, 2010.
- [103] B. J. Kirby and E. F. Hasselbrink, "Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 2, pp. 187–202, 2004.
- [104] J. Liu, T. Gong, C. Wang, Z. Zhong, and Z. Zhang, "Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization," *Int. J. Pharm.*, vol. 340, no. 1–2, pp. 153–162, 2007.
- [105] D. S. Watson, A. N. Endsley, and L. Huang, "Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens," *Vaccine*, vol. 30, no. 13, pp. 2256–2272, 2012.
- [106] Y. Pang *et al.*, "Reduction of Salmonella Enteritidis number after infections by immunization of liposome-associated recombinant SefA," *Avian Dis.*, vol. 57, no. 3, pp. 627–633, 2013.
- [107] D. J. Wilson and R. N. González, "Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis," *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.*, vol. 19, no. 1, pp. 187–197, 2003.
- [108] R. J. Erskine, E. J. VanDyk, P. C. Bartlett, J. L. Burton, and M. C. Boyle, "Effect of hyperimmunization with an Escherichia coli J5 bacterin in adult lactating dairy cows," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 231, no. 7, pp. 1092–1097, 2007.
- [109] B. G. Talbot and P. Lacasse, "Progress in the development of mastitis vaccines," *Livest. Prod. Sci.*, vol. 98, no. 1–2, pp. 101–113, 2005.
- [110] R. L. Chandler, "Experimental bacterial mastitis in the mouse," *J. Med. Microbiol.*, vol. 3, pp. 273–282, 1970.
- [111] J. Lee, M. J. Paape, T. H. Elsasser, and X. Zhao, "Recombinant soluble CD14 reduces severity of intramammary infection by Escherichia coli," *Infect. Immun.*, vol. 71, no. 7, pp. 4034–4039, 2003.
- [112] E. Brouillette, G. Grondin, B. G. Talbot, and F. Malouin, "Inflammatory cell infiltration as an indicator of Staphylococcus aureus infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis," *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 104, no. 3–4, pp. 163–169, 2005.
- [113] H. B. Xiao, C. R. Wang, Z. K. Liu, and J. Y. Wang, "LPS induces pro-inflammatory response in mastitis mice and mammary epithelial cells: Possible involvement of NF- $\kappa$ B signaling and OPN," *Pathol. Biol.*, vol. 63, no. 1, pp. 11–16, 2015.
- [114] W. V. Ingman, D. J. Glynn, and M. R. Hutchinson, "Mouse models of mastitis - How physiological are they?," *Int. Breastfeed. J.*, vol. 10, no. 1, 2015.
- [115] J. C. Anderson and D. J. Heneghan, "Extrapolation from experimental chronic staphylococcal mastitis in mice to experimental infections in cattle.," *Br. Vet. J.*, vol. 135, no. 6, pp. 527–35, 1979.
- [116] A. H. Johnson, "Composition of milk," in *Fundamentals of dairy chemistry*, 2th ed., B. H. Webb, A. H. Johnson, and J. A. Alford, Eds. Westport: AVI Publishing Co., 1974, pp. 1–57.
- [117] L. C. Chosewood and D. E. Wilson, "Section III: principles of biosafety," in *Centers for disease control and prevention, CDC. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*, 5th ed.,

Washington, United States: U.S. Government printing office, 2009, pp. 22–29.

- [118] C. H. Lee and C. M. Tsai, “Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation,” *Anal. Biochem.*, vol. 267, no. 1, pp. 161–168, 1999.
- [119] H. R. Cheng and N. Jiang, “Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 28, no. 1, pp. 55–59, 2006.
- [120] European Pharmacopoeia Commission, “Phar. Eur. 20601: 2.6. Biological tests: sterility,” in *European Pharmacopoeia*, 7th ed., France, 2005, pp. 153–156.
- [121] T. Akerlund, K. Nordström, and R. Bernander, “Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*,” *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 23, pp. 6791–6797, 1995.
- [122] D. B. Morton and P. H. Griffiths, “Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment.,” *Vet. Rec.*, vol. 116, no. 16, pp. 431–436, Apr. 1985.
- [123] A. J. Bramley, A. H. Patel, M. O’Reilly, R. Foster, and T. J. Foster, “Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland,” *Infect. Immun.*, vol. 57, no. 8, pp. 2489–2494, 1989.
- [124] S. Elazar, E. Gonen, A. Livneh-Kol, I. Rosenshine, and N. Y. Shpigel, “Neutrophil recruitment in endotoxin-induced murine mastitis is strictly dependent on mammary alveolar macrophages,” *Vet. Res.*, vol. 41, no. 1, 2010.
- [125] J. Zheng, A. D. Watson, and D. E. Kerr, “Genome-wide expression analysis of lipopolysaccharide induced mastitis in a mouse model,” *Infect. Immun.*, vol. 74, no. 3, pp. 1907–1915, 2006.
- [126] D. J. Glynn, M. R. Hutchinson, and W. V. Ingman, “Toll-Like receptor 4 regulates lipopolysaccharide-induced inflammation and lactation insufficiency in a mouse model of mastitis,” *Biol. Reprod.*, vol. 90, no. 5, 2014.
- [127] N. Chiang *et al.*, “Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements,” *Nature*, vol. 484, no. 7395, pp. 524–528, 2012.
- [128] T. Lian and R. J. Ho, “Trends and developments in liposome drug delivery systems.,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, no. 6, pp. 667–680, Jun. 2001.
- [129] A. G. Allison and G. Gregoriadis, “Liposomes as immunological adjuvants.,” *Nature*, vol. 252, no. 5480, p. 252, Nov. 1974.
- [130] D. Wojnicz and A. Cisowska, “Composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli* strains in relation to serum susceptibility after exposure to subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 33, no. 6, pp. 579–582, 2009.
- [131] O. Agafitei, E. J. E. Kim, T. Maguire, and J. Sheridan, “The role of *Escherichia coli* porins OmpC and OmpF in antibiotic cross resistance induced by subinhibitory concentrations of kanamycin,” *J. Exp. Microbiol.*, vol. 14, no. April 2010, pp. 34–39, 2010.
- [132] Z. Tie, W. Chun-guang, and Z. Xing-hua, “Clinical isolating outer membrane protein pattern from Avian *Escherichia coli* of China,” *J. Microbiol.*, vol. 4, no. 14, pp. 4–7, 2010.
- [133] R. Urban-Chmiel, M. Dec, A. Puchalski, and A. Wernicki, “Characterization of heat-shock proteins in *Escherichia coli* strains under thermal stress in vitro,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 62, no. PART 12, pp. 1897–1901, 2013.

- [134] B. Dehghani, M. Mottamedifar, H. Khoshkham-Roodmajani, A. Hassanzadeh, K. Zomorrodian, and A. Rahimi, "SDS-PAGE analysis of the outer membrane proteins of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients in different wards of Nemazee Hospital, Shiraz, Iran," *Iran J Med Sci*, vol. 41, no. 5, pp. 399–405, 2016.
- [135] X. Wang *et al.*, "Escherichia coli outer membrane protein F (OmpF): an immunogenic protein induces cross-reactive antibodies against Escherichia coli and Shigella," *AMB Express*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [136] C. Liu *et al.*, "Immunogenic characterization of outer membrane porins OmpC and OmpF of porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 337, no. 2, pp. 104–111, 2012.
- [137] M. P. Molloy *et al.*, "Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 10, pp. 2871–2881, 2000.
- [138] A. L. Hughes and H. Piontkivska, "Functional diversification of the toll-like receptor gene family," *Immunogenetics*, vol. 60, no. 5, pp. 249–256, 2008.
- [139] M. Larginho, H. M. Santos, G. Doria, H. Scholz, P. V. Baptista, and J. L. Capelo, "Development of a fast and efficient ultrasonic-based strategy for DNA fragmentation," *Talanta*, vol. 81, no. 3, pp. 881–886, 2010.
- [140] L. J. Lee and M. Abdullah, "Optimization of genomic DNA shearing by sonication for next-generation sequencing library preparation," *Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.*, vol. 22, no. 3, pp. 200–208, 2014.
- [141] D. G. Pitcher, N. A. Saunders, and R. J. Owen, "Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 8, no. 4, pp. 151–156, 1989.
- [142] Y. Zhang, F. Buchholz, J. P. P. Muyrers, and A. F. Stewart, "A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*," *Nat. Genet.*, vol. 20, no. october, pp. 123–128, 1998.
- [143] A. Steimle, I. B. Autenrieth, and J. S. Frick, "Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 306, no. 5, pp. 290–301, 2016.
- [144] K. A. Fitzgerald, D. C. Rowe, and D. T. Golenbock, "Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex," *Microbes Infect.*, vol. 6, no. 15, pp. 1361–1367, 2004.
- [145] M. L. DeMarco and R. J. Woods, "From agonist to antagonist: structure and dynamics of innate immune glycoprotein MD-2 upon recognition of variably acylated bacterial endotoxins," *Mol. Immunol.*, vol. 49, no. 1–2, pp. 124–133, 2011.
- [146] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Control of adaptive immunity by the innate immune system," *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 4, pp. 343–353, 2015.
- [147] N. Tanimura, S. Saitoh, F. Matsumoto, S. Akashi-Takamura, and K. Miyake, "Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 368, no. 1, pp. 94–99, 2008.
- [148] M. S. Quesenberry and Y. C. Lee, "A rapid formaldehyde assay using Purpald reagent: application under periodation conditions," *Anal. Biochem.*, vol. 234, no. 1, pp. 50–55, 1996.
- [149] J. S. Lam, E. M. Anderson, and Y. Hao, "LPS quantification procedures," in *Pseudomonas methods and protocols. methods in molecular biology (Methods and protocols)*, A. Filloux and J. L. Ramos, Eds. New York: Humana Press Inc., 2014.
- [150] A. Galeev, "Evaluating the effect of different growth conditions on glycoconjugate expression in *Campylobacter coli*: a methodological perspective," University of Helsinki, Finland, 2016.

- [151] A. P. De Santana-Filho, G. R. Noletto, P. A. J. Gorin, L. M. De Souza, M. Iacomini, and G. L. Sasaki, "GC-MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 4, pp. 2730–2734, 2012.
- [152] V. Manolova, A. Flace, M. Bauer, K. Schwarz, P. Saudan, and M. F. Bachmann, "Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 5, pp. 1404–1413, 2008.
- [153] A. M. Carmona-Ribeiro, "Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 5, no. 1, pp. 249–259, 2010.
- [154] A. Badiie *et al.*, "The role of liposome size on the type of immune response induced in BALB/c mice against leishmaniasis: rgp63 as a model antigen," *Exp. Parasitol.*, vol. 132, no. 4, pp. 403–409, 2012.
- [155] A. S. Ulrich, "Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles," *Biosci. Rep.*, vol. 22, no. 2, pp. 129–150, 2002.
- [156] K. S. Korsholm, P. L. Andersen, and D. Christensen, "Cationic liposomal vaccine adjuvants in animal challenge models: overview and current clinical status," *Expert Rev. Vaccines*, vol. 11, no. 5, pp. 561–577, 2012.
- [157] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, and S. Seal, "Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential," *Biomaterials*, vol. 28, no. 31, pp. 4600–4607, 2007.
- [158] S. Honary and F. Zahir, "Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (part 2)," *Trop. J. Pharm. al Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 265–273, 2013.
- [159] E. O' Doherty, R. Sayers, L. O' Grady, and L. Shalloo, "Effect of exposure to *Neospora caninum*, *Salmonella*, and *Leptospira interrogans* serovar Hardjo on the economic performance of Irish dairy herds," *J. Dairy Sci.*, vol. 98, no. 4, pp. 2789–2800, 2015.
- [160] H. Keshavarzi, A. Sadeghi-Sefidmazgi, A. R. Kristensen, and A. H. Stygar, "Abortion studies in Iranian dairy herds: I. Risk factors for abortion," *Livest. Sci.*, vol. 195, no. November 2016, pp. 45–52, 2017.
- [161] H. Miki, C. Nakahashi-Oda, T. Sumida, and A. Shibuya, "Involvement of CD300a phosphatidylserine immunoreceptor in aluminum salt adjuvant-induced Th2 responses," *J. Immunol.*, vol. 194, no. 11, pp. 5069–5076, 2015.
- [162] B. Sun *et al.*, "Enhanced immune adjuvant activity of aluminum oxyhydroxide nanorods through cationic surface functionalization," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 26, pp. 21697–21705, 2017.
- [163] G. Trinchieri, "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 2, pp. 133–146, 2003.
- [164] R. Suresh and D. M. Mosser, "Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology," *AJP Adv. Physiol. Educ.*, vol. 37, no. 4, pp. 284–291, 2013.
- [165] M. G. Netea, J. W. M. Van Der Meer, R. P. Sutmoller, G. J. Adema, and B. Kullberg, "From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-Like receptor/T-helper bias," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 10, pp. 3991–3996, 2005.
- [166] B. Pulendran, "Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors," *Immunol. Rev.*, vol. 199, pp. 227–250, 2004.
- [167] G. M. Barton and R. Medzhitov, "Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors,"

*Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, no. 3, pp. 380–383, 2002.

- [168] S. Agrawal *et al.*, “Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 10, pp. 4984–4989, 2003.
- [169] T. Kaisho, K. Hoshino, T. Iwabe, O. Takeuchi, T. Yasui, and S. Akira, “Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support Th2 cell differentiation,” *Int Immunol*, vol. 14, no. 7, pp. 695–700, 2002.
- [170] H. Salmon, “The mammary gland and neonate mucosal immunity,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 143–155, Dec. 1999.
- [171] W. L. Hurley and P. K. Theil, “Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk,” *Nutrients*, vol. 3, no. 4, pp. 442–474, 2011.
- [172] E. Boerhout *et al.*, “Immunization routes in cattle impact the levels and neutralizing capacity of antibodies induced against *S. aureus* immune evasion proteins,” *Vet. Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 1–9, 2015.
- [173] R. M. Akers and S. C. Nickerson, “Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 16, no. 4, pp. 275–289, 2011.
- [174] K. Kobayashi, T. Uejyo, S. Oyama, M. M. Rahman, and H. Kumura, “Histological analysis of mammary gland remodeling caused by lipopolysaccharide in lactating mice,” *Cell Tissue Res.*, vol. 354, no. 2, pp. 495–506, 2013.
- [175] L. M. Sordillo, S. C. Nickerson, R. M. Akers, and S. P. Oliver, “Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis,” *Int. J. Biochem.*, vol. 19, no. 12, pp. 1165–1172, 1987.
- [176] J. E. Butler and M. E. Kehrli, “Immunoglobulins and immunocytes in the mammary gland and its secretions,” in *Mucosal immunology*, 3th ed., J. Mestecky, M. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J. R. McGhee, and L. Mayer, Eds. Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press, 2005, pp. 1764–1793.
- [177] M. Alkafafy, R. Rashed, and A. Helal, “Immunohistochemical studies on the bovine lactating mammary gland (*Bos taurus*),” *Acta Histochem.*, vol. 114, no. 2, pp. 87–93, 2012.
- [178] F. Thomas, H. Haining, M. Stevenson, H. Thompson, A. Solomon, and P. Eckersall, “Immunohistochemical localization of Haptoglobin in the bovine mammary gland,” *Alexandria J. Vet. Sci.*, vol. 50, no. 1, pp. 65–69, 2016.

## TABLAS

**Tabla 1.** Número de glándulas mamarias positivas al cultivo bacteriológico y recuento bacteriano tisular promedio (UFC/g), por tratamiento intramamario (PBS estéril o inóculo bacteriano), según inóculo bacteriano teórico y real utilizados (UFC/mL).

<b>Inóculo teórico (UFC/mL)</b>	<b>Inóculo real (UFC/mL)</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Glándulas inoculadas</b>	<b>Glándulas positivas</b>	<b>Recuento promedio (UFC/g)</b>
<b>10<sup>4</sup></b>	$4,37 \times 10^4$	PBS estéril	4	0	0
		Inóculo	4	2	$9,50 \times 10^3$
<b>10<sup>5</sup></b>	$3,29 \times 10^5$	PBS estéril	4	0	0
		Inóculo	4	4	$1,42 \times 10^7$
<b>10<sup>6</sup></b>	$3,97 \times 10^6$	PBS estéril	4	0	0
		Inóculo	4	4	$2,60 \times 10^7$

**Tabla 2.** Cuantificación de patrones moleculares bacterianos en proteoliposomas de *E. coli* RM5278 según el patrón molecular evaluado y método de cuantificación.

<b>Parámetro</b>	<b>Método</b>	<b>Resultado</b>
<b>Proteínas totales (µg/mL)</b>	<i>BCA Protein Assay Kit</i> (Novagen®, Merck)	5.596,141 ± 509,050
<b>Material genético (ng/µL)</b>	Incubación a 95 °C por 10 minutos	1.102,228 ± 114,727 (1,347 ± 0,042)
	Extracción con fenol-cloroformo	39,825 ± 15,991 (1,010 ± 0,019)
<b>LPS (mg/mL)</b>	Ensayo Purpald	97,890 ± 7,548

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de 3 lotes de producción y son entregados en sus unidades respectivas (proteínas totales = µg/mL; material genético = ng/µL; LPS = mg/mL). Para la cuantificación de material genético, los valores entre paréntesis corresponden al promedio ± desviación estándar de las relaciones 260/280 para cada método empleado.

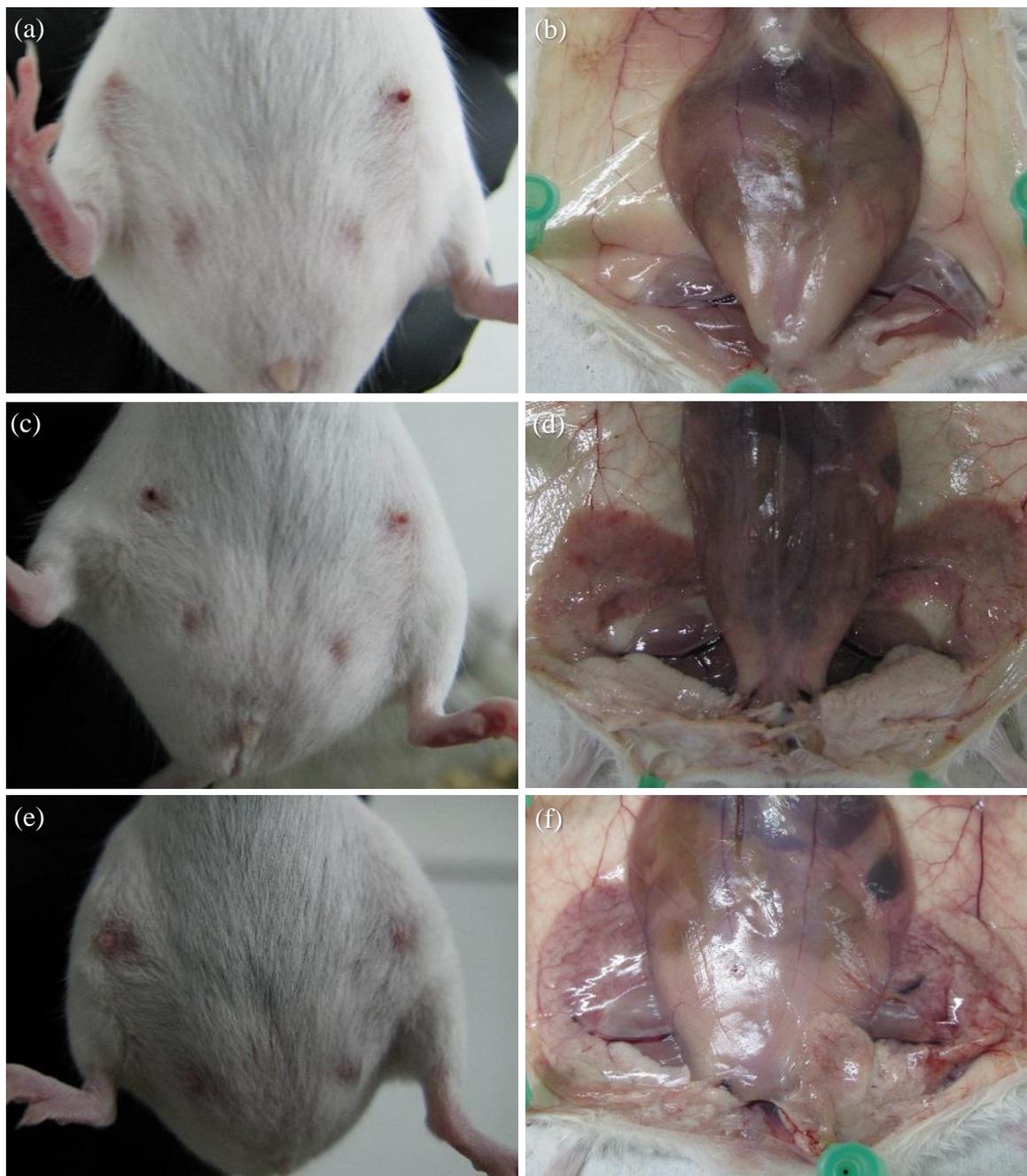
**Tabla 3.** Número de hembras preñadas al día 25 del ensayo y tamaño de camada observado dentro de las 12 horas post parto, según tratamiento

<b>Parámetro</b>	<b>Placebo</b>	<b>Vacuna</b>
<b>Número de hembras preñadas al día 25 (n = 8)</b>	6	7
<b>Número de crías/hembra (promedio ± desviación estándar) dentro de las 12 horas post parto</b>	10,5 ± 1,049	10 ± 1,414

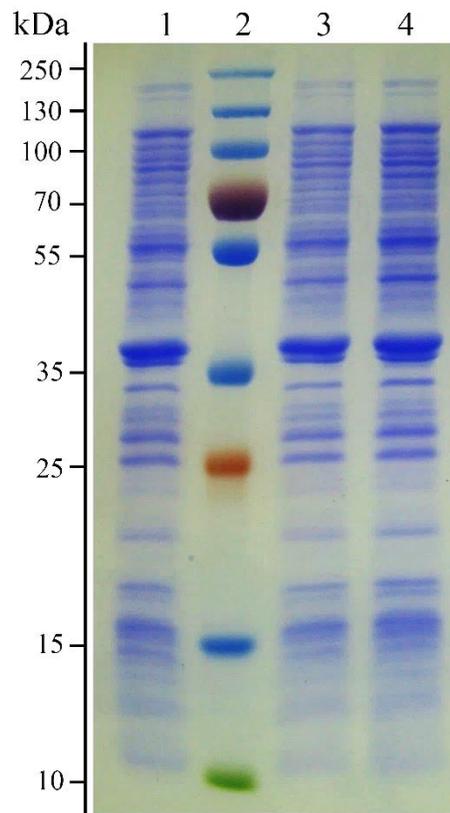
**Tabla 4.** Número y porcentaje de glándulas mamarias positivas al cultivo bacteriológico, por tipo de desafío intramamario (PBS estéril o inóculo bacteriano), según tratamiento

<b>Tratamiento</b>	<b>PBS estéril (3<sup>ra</sup> glándula derecha)</b>		<b>Inóculo bacteriano (4<sup>ta</sup> glándula derecha)</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Placebo	2	33,33	6	100
Vacuna	0	0,00	5	71,43

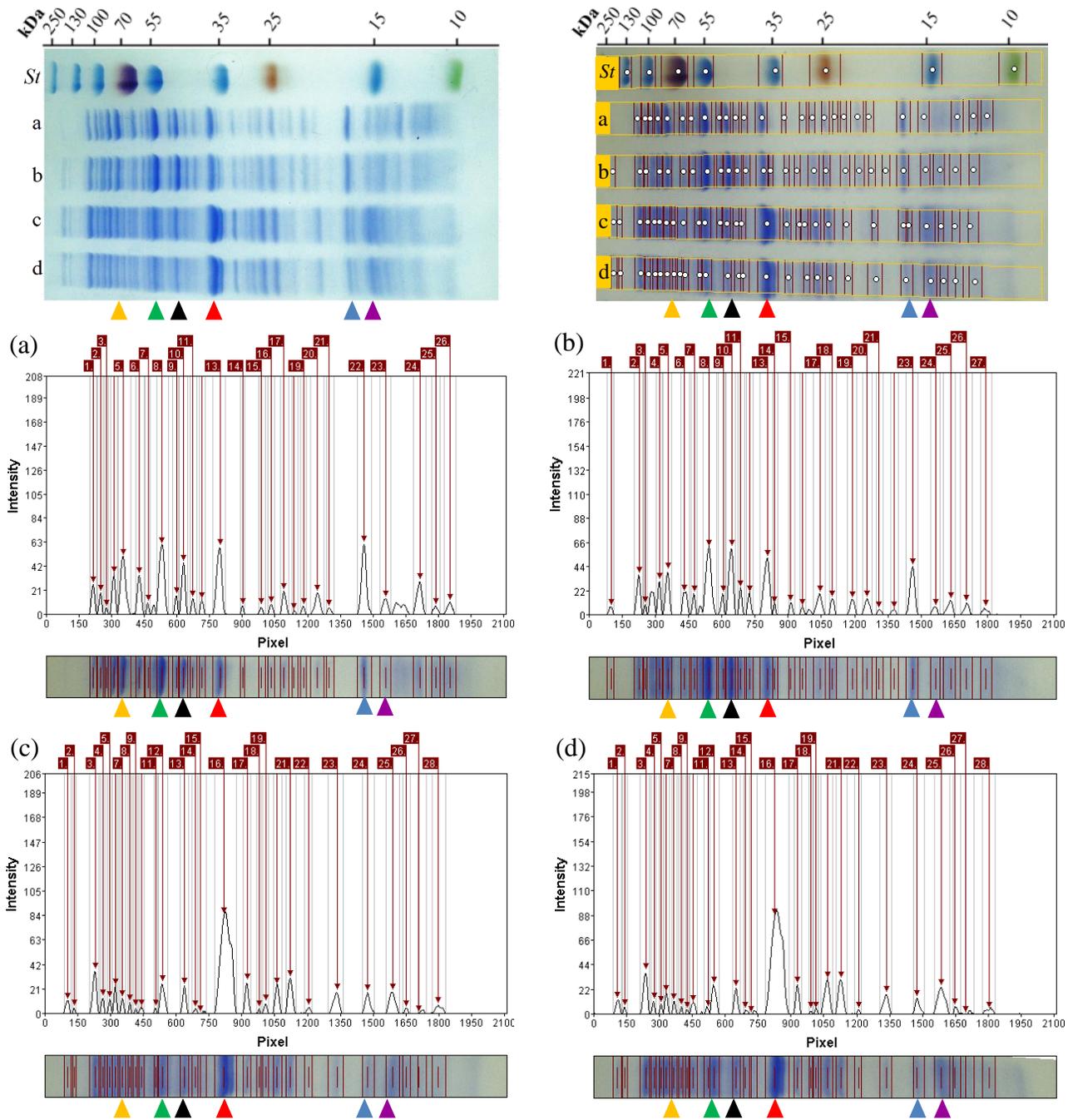
## FIGURAS



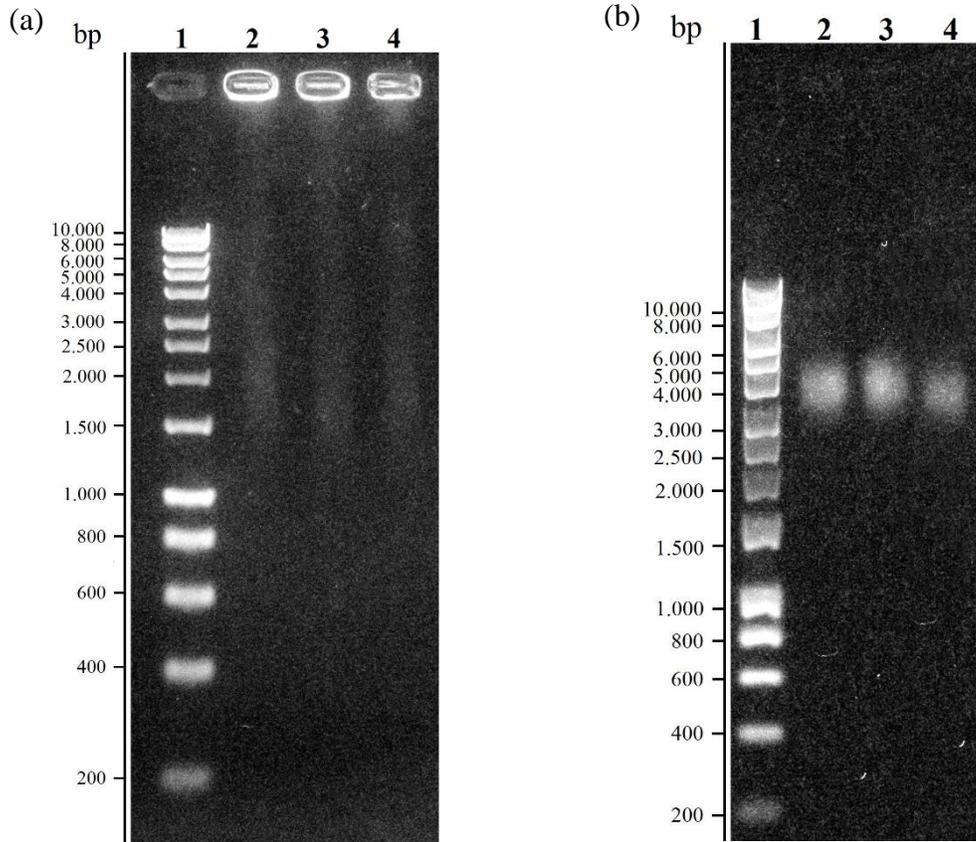
**Figura 1. Establecimiento de un modelo experimental de mastitis clínica coliforme en ratonas lactantes.** Las glándulas mamarias del 3<sup>er</sup> par fueron inoculadas con 50  $\mu$ L/glándula de PBS estéril como control negativo, mientras las glándulas del 4<sup>to</sup> par fueron inoculadas con 50  $\mu$ L/glándula de las 3 distintas concentraciones bacterianas en estudio:  $10^4$  UFC/mL (a y b);  $10^5$  UFC/mL (c y d) y  $10^6$  UFC/mL (e y f). Las fotografías muestran cambios macroscópicos externos e internos representativos, según la dosis evaluada. Cada par horizontal corresponde a la misma ratona dentro de cada grupo experimental.



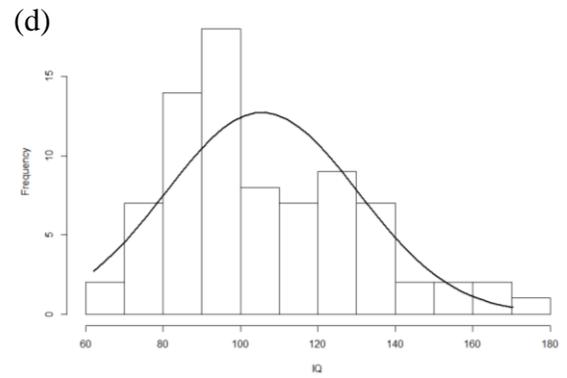
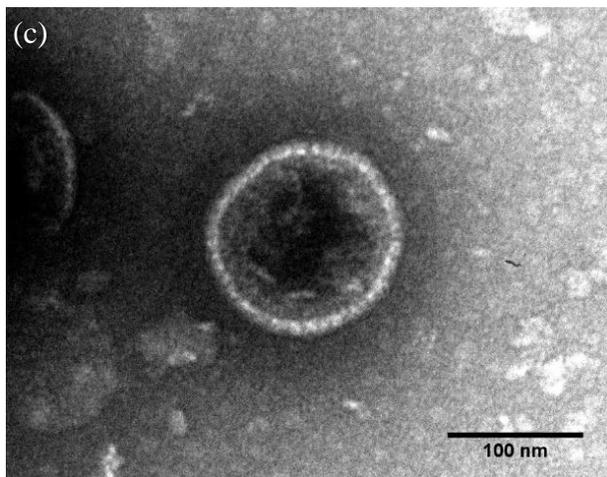
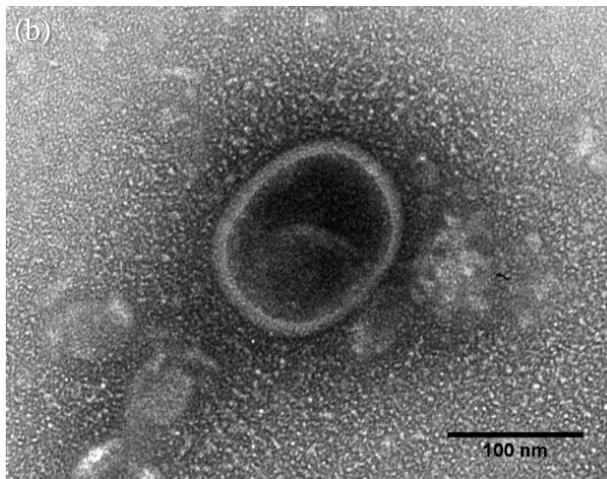
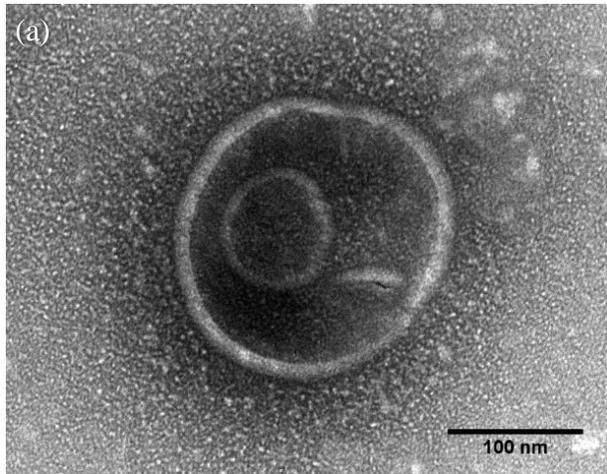
**Figura 2. Patrón de proteínas totales de proteoliposomas de *E. coli* RM5278.** Mediante SDS-PAGE 12,5% se analizó el patrón de proteínas totales en 3 lotes de producción de proteoliposomas de *E. coli* (**carriles 1, 3 y 4**). Cada carril (lote) fue cargado con igual cantidad de proteínas (17 µg/carril). El **carril 2** corresponde al estándar de peso molecular (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific).



**Figura 3. Electroferograma del patrón de proteínas totales entre distintas fracciones obtenidas durante la producción de proteoliposomas de *E. coli* RM5278.** Distintas fracciones obtenidas de un mismo proceso de producción de proteoliposomas (**a** = sedimento bacteriano; **b** = sedimento bacteriano sonificado; **c** = sedimento de membranas bacterianas; **d** = proteoliposomas bacterianos) fueron analizadas mediante SDS-PAGE y luego mediante *software* *GelAnalyzer2010a*. Cada carril fue cargado con igual cantidad de proteínas (17  $\mu\text{g}$ /carril). Cabezas de flecha de igual color indican bandas de proteínas homólogas entre distintas fracciones. *St* = estándar de peso molecular (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific).

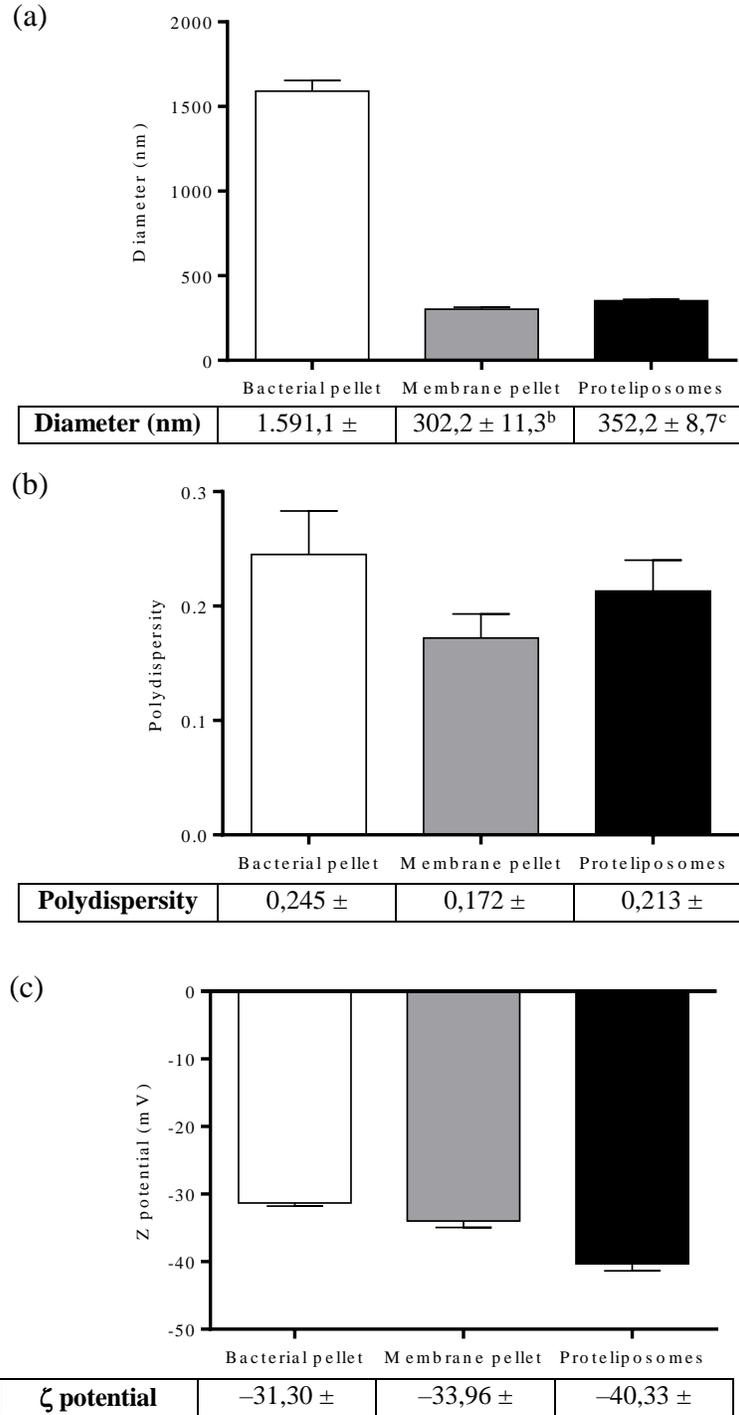


**Figura 4. Visualización de material genético bacteriano incluido en proteoliposomas de *E. coli* RM5278 mediante electroforesis en geles de agarosa-TAE. (a) Muestras incubadas a 95 °C durante 10 minutos; gel de agarosa-TAE 1% (p/v). (b) Muestras sometidas a extracción mediante método de fenol cloroformo-básico; gel de agarosa-TAE 0,7% (p/v). Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a 3 lotes de producción de proteoliposomas. El carril 1 corresponde al estándar de peso molecular (*HyperLadder*<sup>TM</sup> 1 kb, BioSonda).**

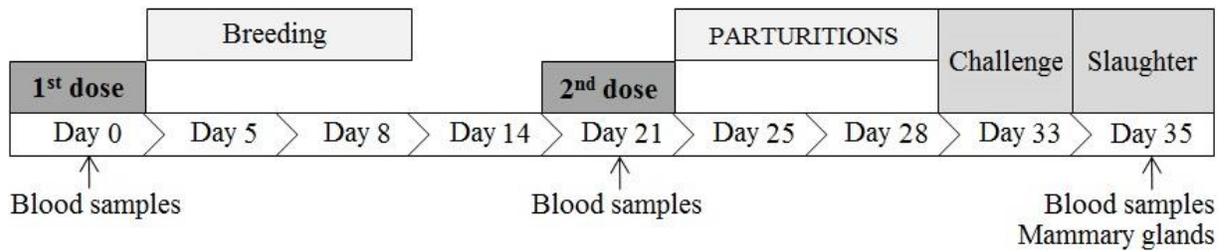


<i>Mean (nm)</i>	<b>105,517</b>
<i>SD (nm)</i>	24,737
<i>Median (nm)</i>	95,947
<i>Minime (nm)</i>	61,947
<i>Maxime (nm)</i>	170,479

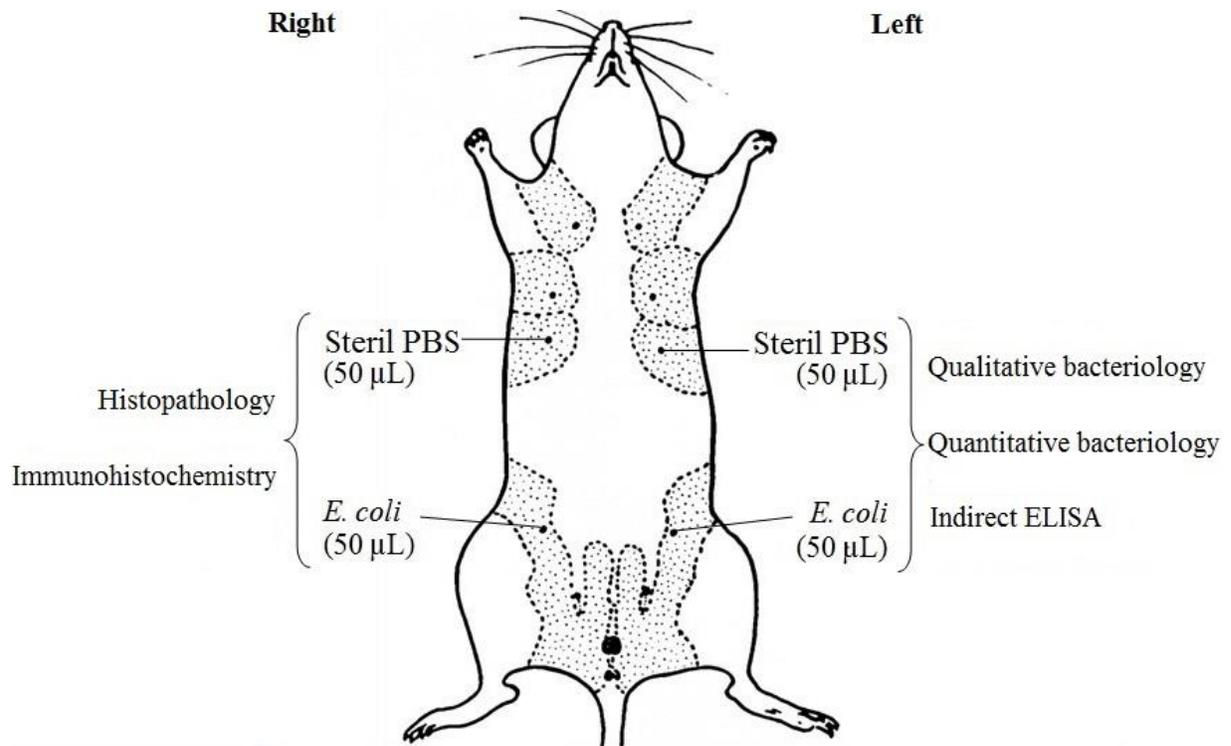
**Figura 5. Visualización y estimación de parámetros físicos en un lote de proteoliposomas de *E. coli* RM5278 mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). (a) Proteoliposoma bilamellar; (b y c) Proteoliposomas monolamelares; (d) Mediante *software ImageJ* 1,51n se analizaron 80 vesículas seleccionadas al azar entre 32 fotografías, registrándose estimadores estadísticos asociados al tamaño. Barra = 100 nm.**



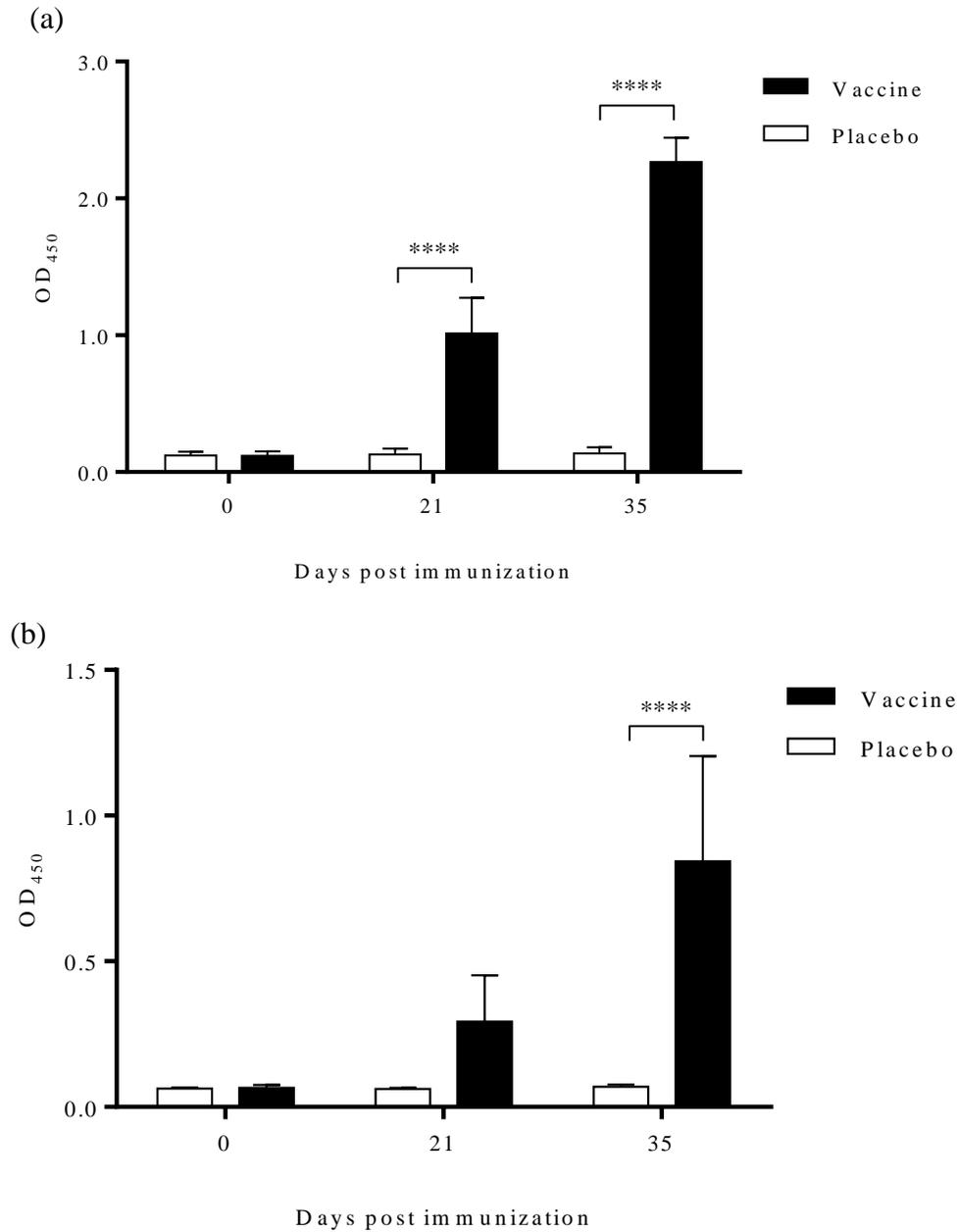
**Figura 6. Estimación de parámetros fisicoquímicos de proteoliposomas de *E. coli* RM5278 mediante equipo Brookhaven ZetaPlus.** Distintas fracciones obtenidas durante un mismo proceso de producción de proteoliposomas de *E. coli* (sedimento bacteriano, sedimento de membranas bacterianas y proteoliposomas bacterianos) fueron recolectadas para la cuantificación del tamaño promedio de partículas (a), polidispersidad (b) y potencial  $\zeta$  (c). Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 10 mediciones realizadas en cada fracción. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada fila (entre fracciones).



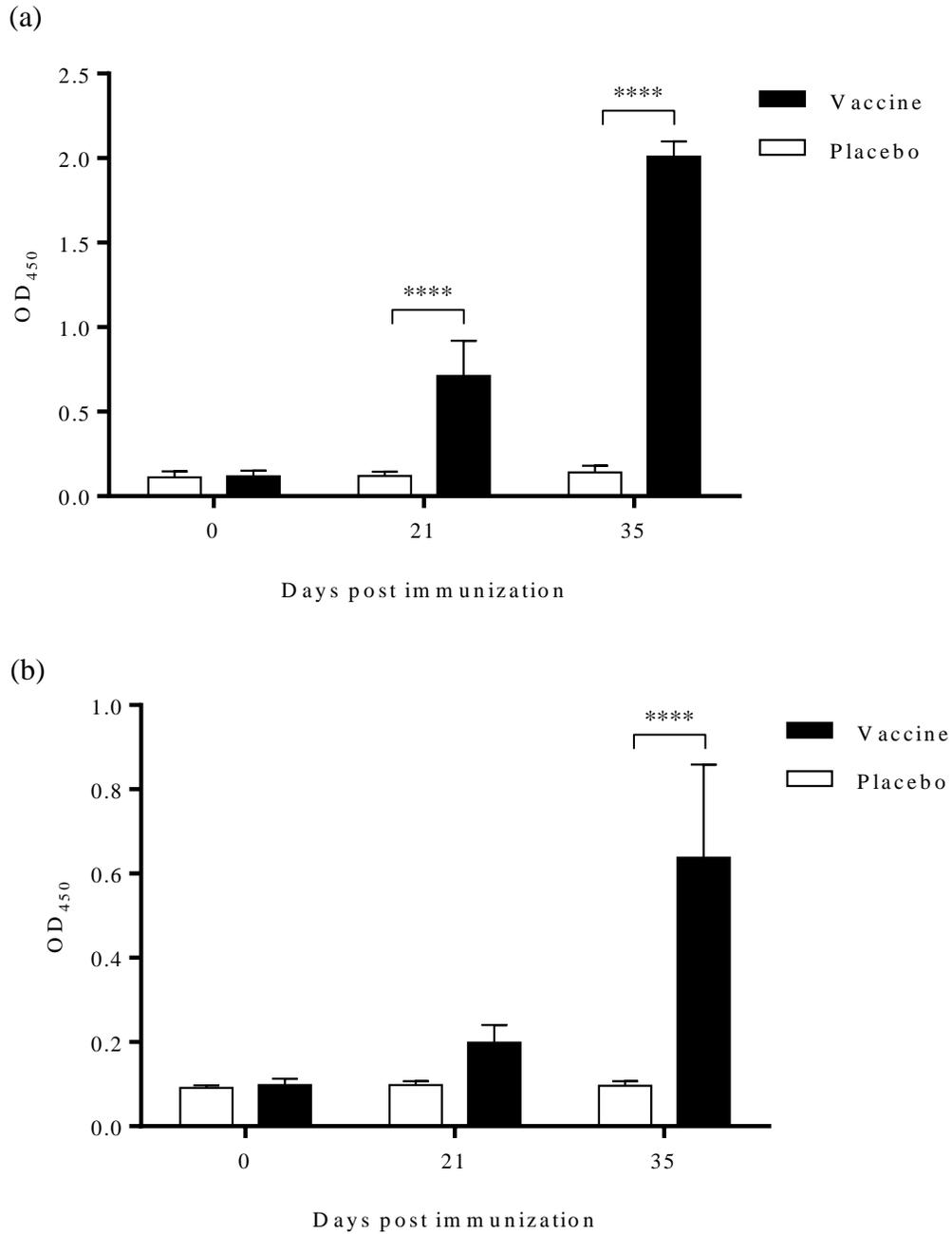
**Figura 7. Diseño del ensayo de vacunación e infección experimental en modelo murino.** Al inicio del ensayo (día 0) las ratonas recibieron una dosis subcutánea de vacuna o placebo, según corresponda. El periodo de reproducción se extendió entre los días 5 y 8 del ensayo. Una segunda dosis subcutánea de vacuna o placebo, según corresponda, fue administrada el día 21 del ensayo. El día 33 del ensayo (5–8 días post parto) se realizó la inoculación intramamaria con la dosis mínima infectante de *E. coli* RM5278 (4<sup>to</sup> par) o PBS estéril (3<sup>o</sup> par). A las 48 horas post inoculación (día 35) las ratonas fueron sacrificadas para la extracción y procesamiento de glándulas mamarias. Las muestras de sangre, para la cuantificación de anticuerpos específicos, fueron extraídas los días 0 (inicio del ensayo), 21 y 35.



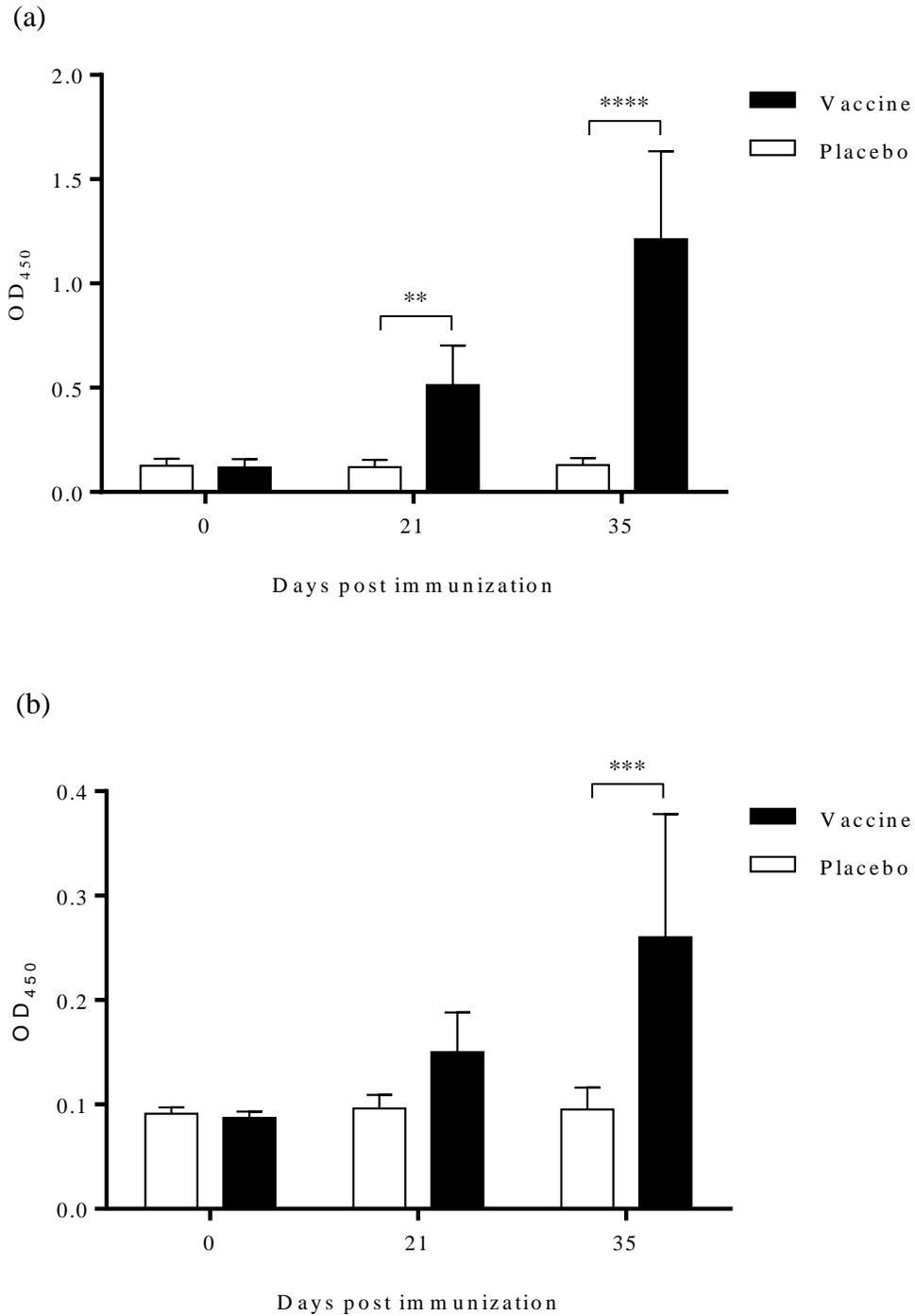
**Figura 8. Desafío intramamario y análisis *post mortem* de glándulas mamarias.** Tras el sacrificio, la zona abdominal fue desinfectada con etanol 70% (v/v) y se abrió completamente desde el cuello hasta la zona pélvica, permitiendo la exposición de las glándulas mamarias. Las glándulas del 3° y 4° par fueron removidas asépticamente y depositadas en placas de Petri estériles. Las glándulas derechas fueron sometidas a análisis histopatológico e inmunohistoquímico (medición de anticuerpos totales), mientras las glándulas izquierdas fueron utilizadas para el análisis bacteriológico y ELISA indirecto (medición de anticuerpos específicos).



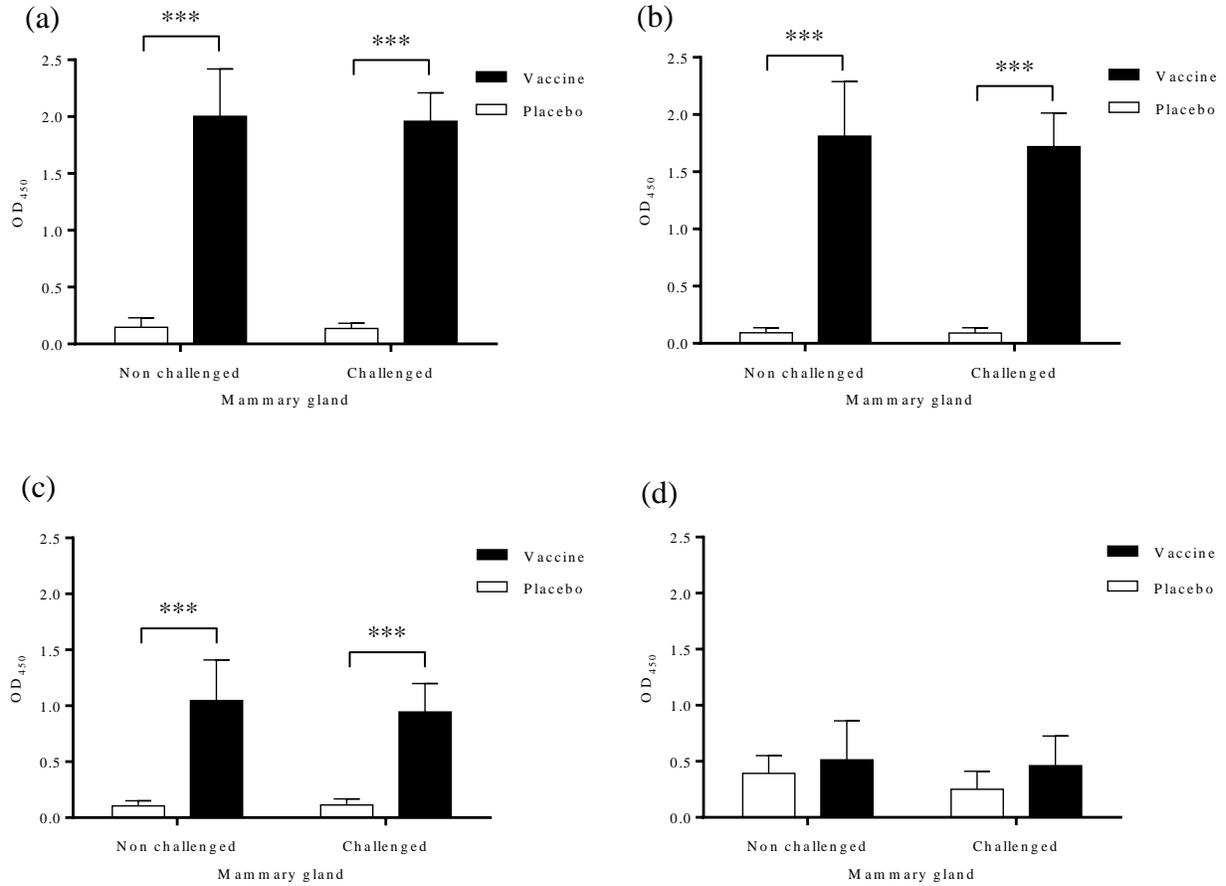
**Figura 9. Niveles (OD<sub>450</sub>) de IgG total específica en sangre.** Se cuantificaron los niveles circulantes de IgG anti-*E. coli* a los días 0, 21 y 35 post vacunación. **(a)** Placas cubiertas con proteoliposomas de *E. coli* RM5278. **(b)** Placas cubiertas con *E. coli* ATCC 25922 inactivada. Los resultados son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .



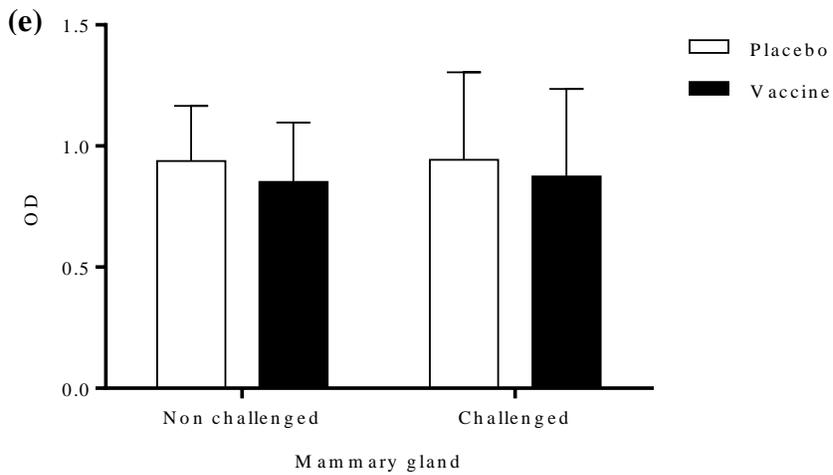
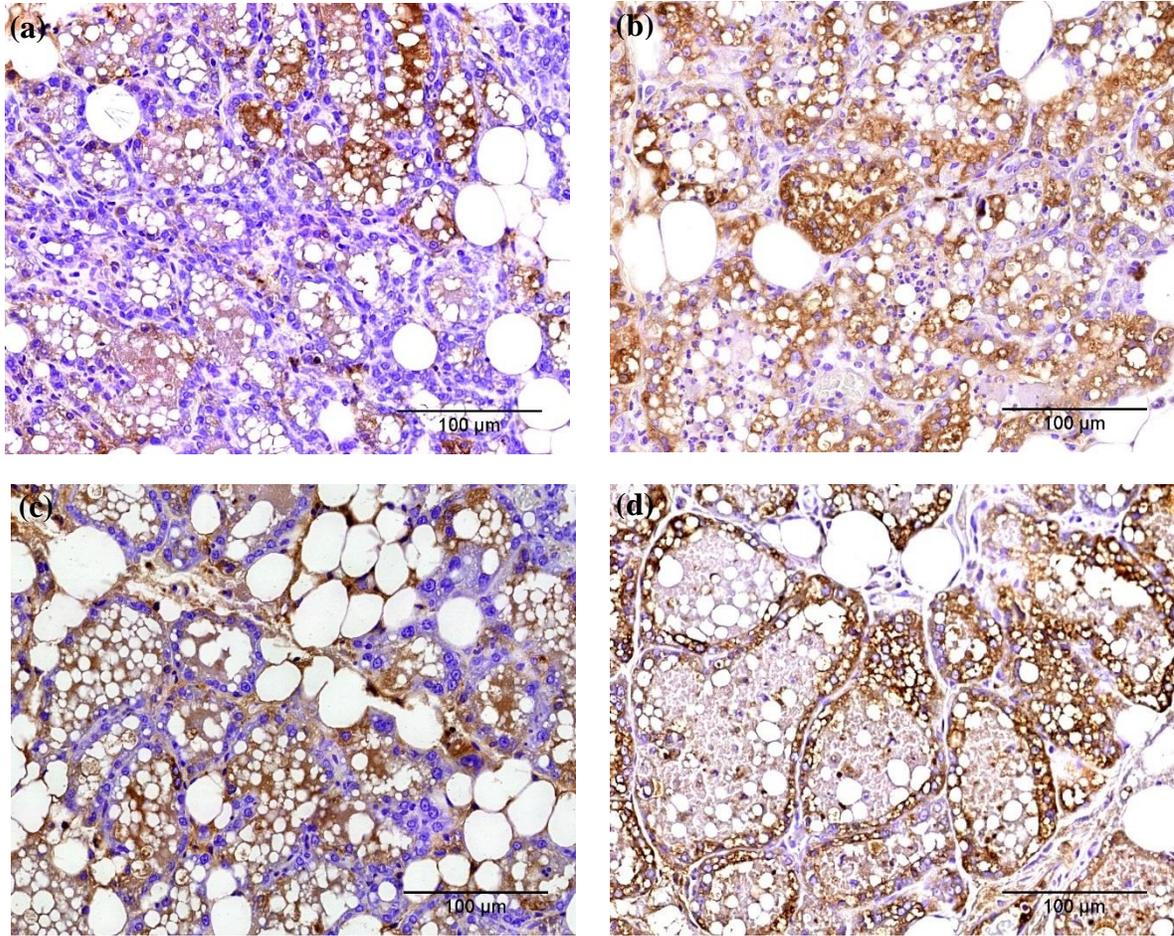
**Figura 10. Niveles (OD<sub>450</sub>) de IgG1 específica en sangre.** Se cuantificaron los niveles circulantes del isotipo IgG1 anti-*E. coli* a los días 0, 21 y 35 post vacunación. **(a)** Placas cubiertas con proteoliposomas de *E. coli* RM5278; **(b)** Placas cubiertas con *E. coli* ATCC 25922 inactivada. Los resultados son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .



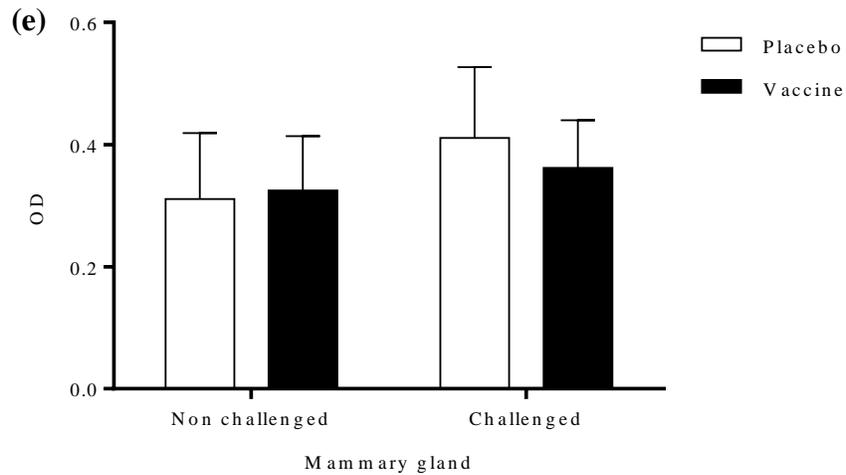
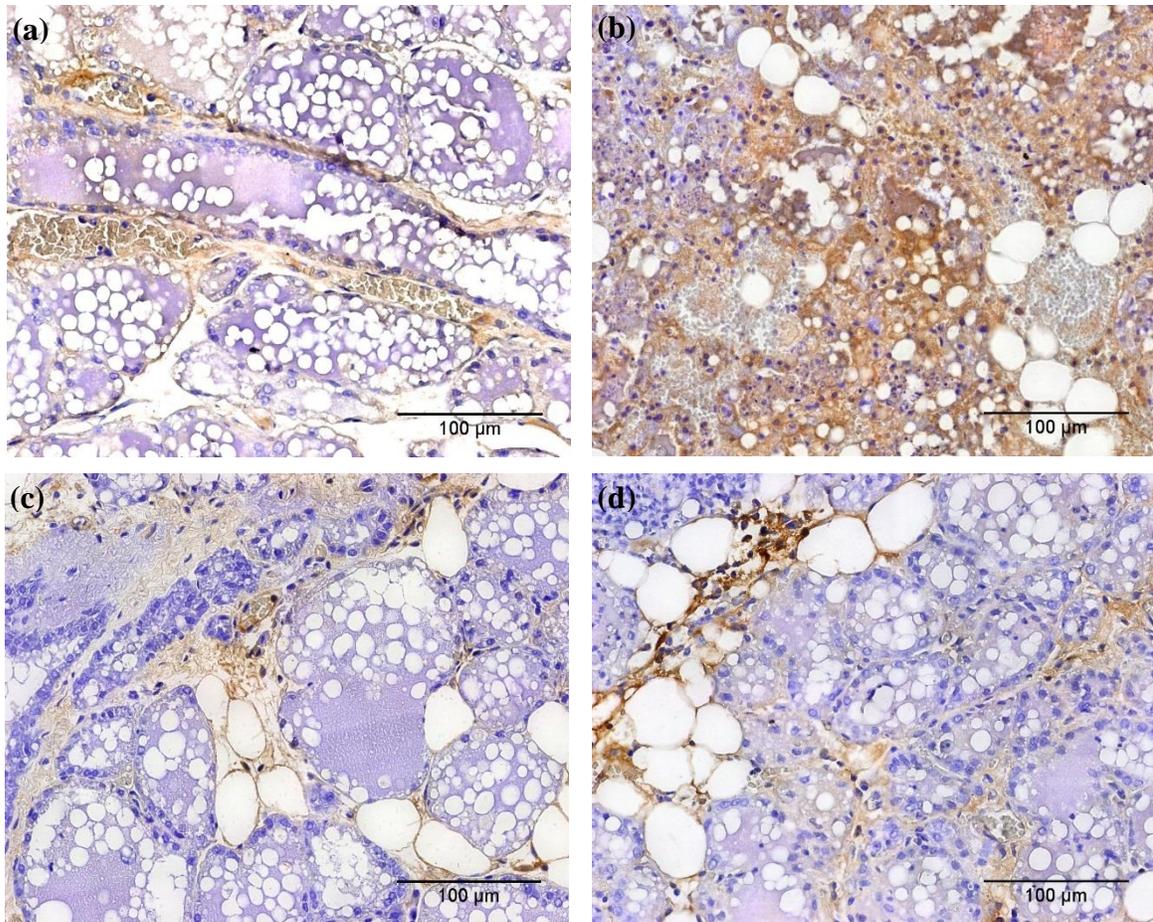
**Figura 11. Niveles (OD<sub>450</sub>) de IgG2a específica en sangre.** Se cuantificaron los niveles circulantes del isotipo IgG2a anti-*E. coli* a los días 0, 21 y 35 post vacunación. (a) Placas cubiertas con proteoliposomas de *E. coli* RM5278. (b) Placas cubiertas con *E. coli* ATCC 25922 inactivada. Los resultados son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ; \*\*\*  $P = 0,0001$ ; \*\*  $P < 0,01$ .



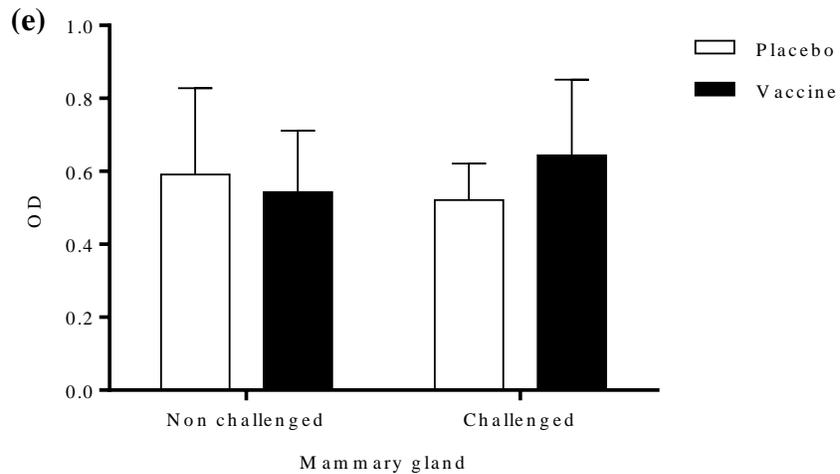
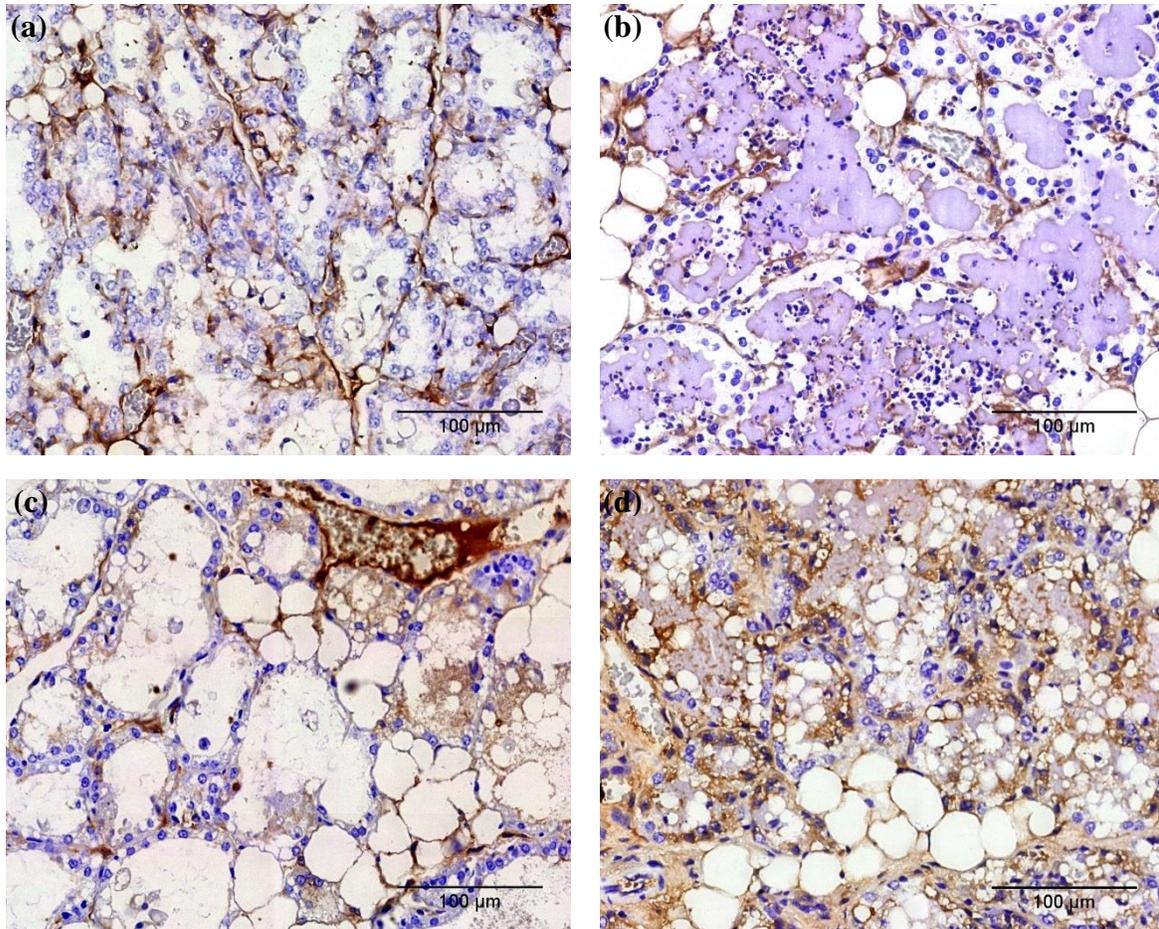
**Figura 12. Niveles (OD<sub>450</sub>) de inmunoglobulinas específicas en glándula mamaria.** Se cuantificaron los niveles locales de anticuerpos anti-*E. coli* a los 35 días post vacunación. (a) IgG; (b) IgG1; (c) IgG2a; (d) IgA. Las placas fueron cubiertas con proteoliposomas de *E. coli* RM5278. Los resultados son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \*\*\*  $P = 0,001$ .



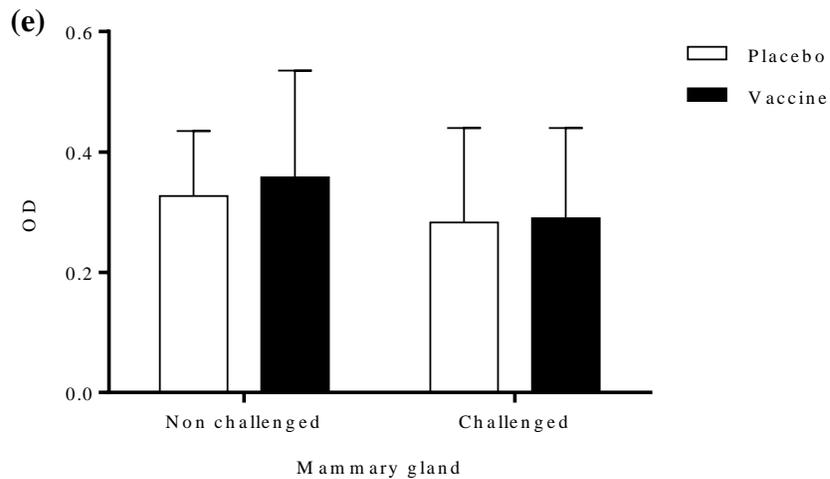
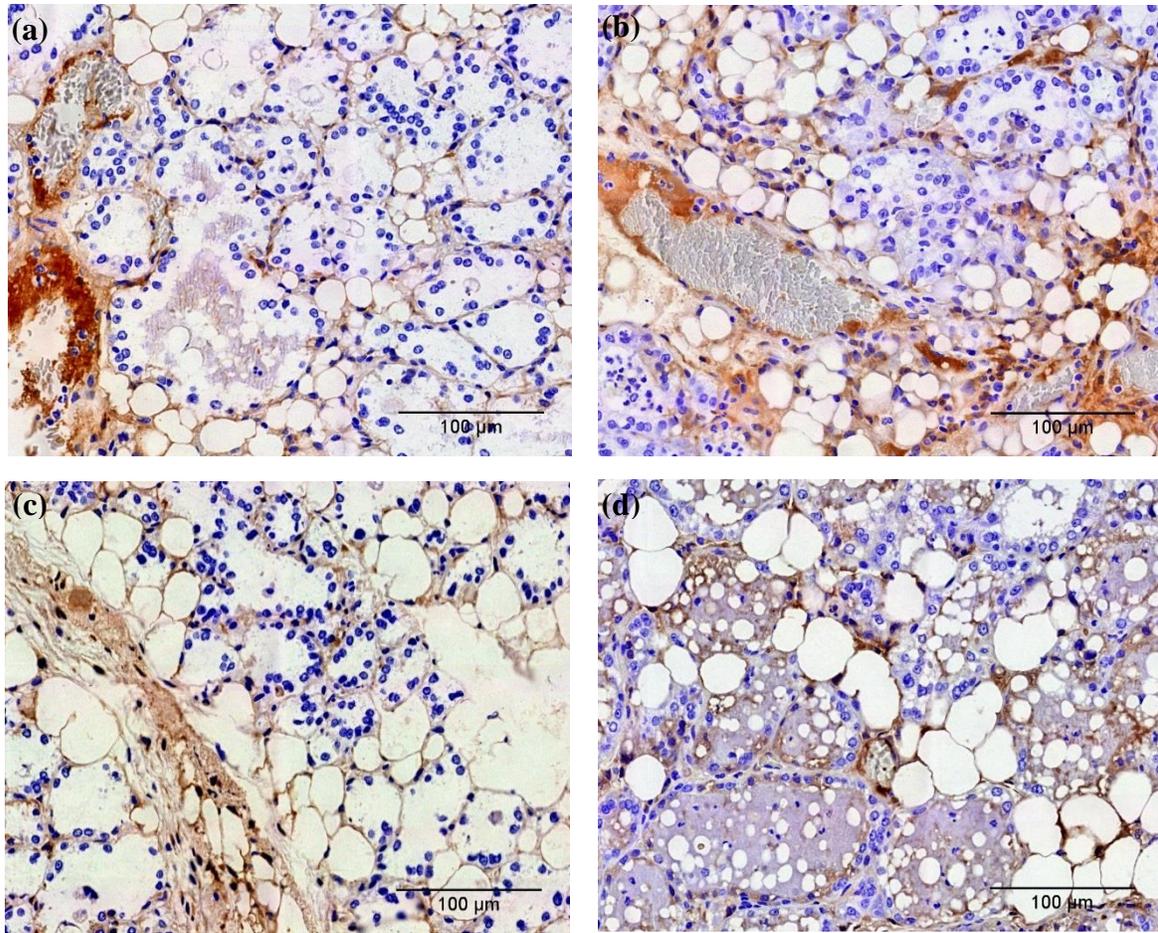
**Figura 13. Detección de IgA total en glándula mamaria.** Mediante inmunohistoquímica se cuantificaron los niveles de IgA total en glándula mamaria a los 35 días post vacunación. Las fotografías muestran inmunotinciones representativas de ambos grupos, contrastadas con Hematoxilina. (a) Glándula no infectada, grupo placebo. (b) Glándula infectada, grupo placebo. (c) Glándula no infectada, grupo vacunado. (d) Glándula infectada, grupo vacunado. (e) Niveles de IgA total (OD) en glándulas mamarias no desafiadas y desafiadas de ambos grupos experimentales; los resultados son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Barra = 100  $\mu$ m.



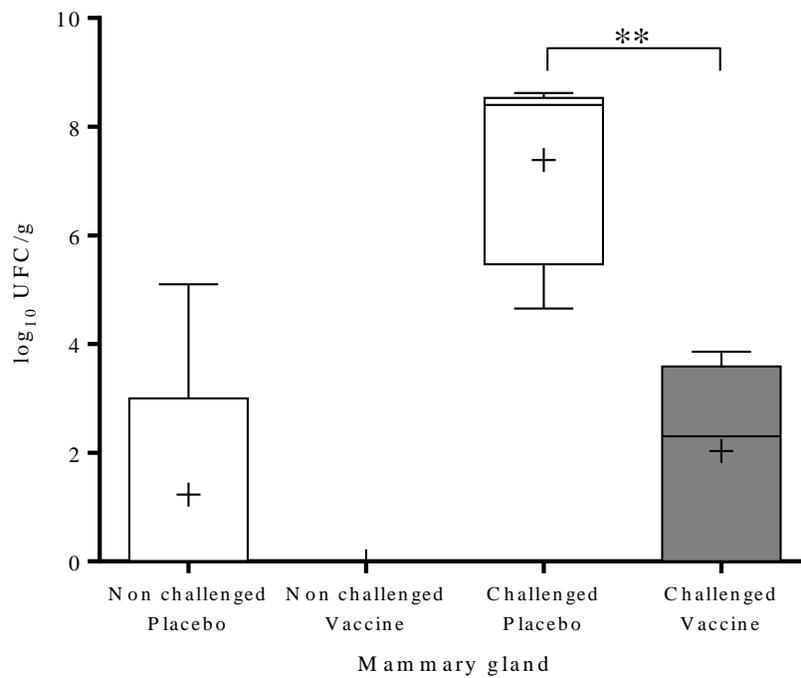
**Figura 14. Detección de IgG total en glándula mamaria.** Mediante inmunohistoquímica se cuantificaron los niveles de IgG total en glándula mamaria a los 35 días post vacunación. Las fotografías muestran inmunotinciones representativas de ambos grupos, contrastadas con Hematoxilina. (a) Glándula no infectada, grupo placebo. (b) Glándula infectada, grupo placebo. (c) Glándula no infectada, grupo vacunado. (d) Glándula infectada, grupo vacunado. (e) Niveles de IgG total (OD) en glándulas mamarias no desafiadas y desafiadas de ambos grupos experimentales; los resultados son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Barra = 100  $\mu$ m.



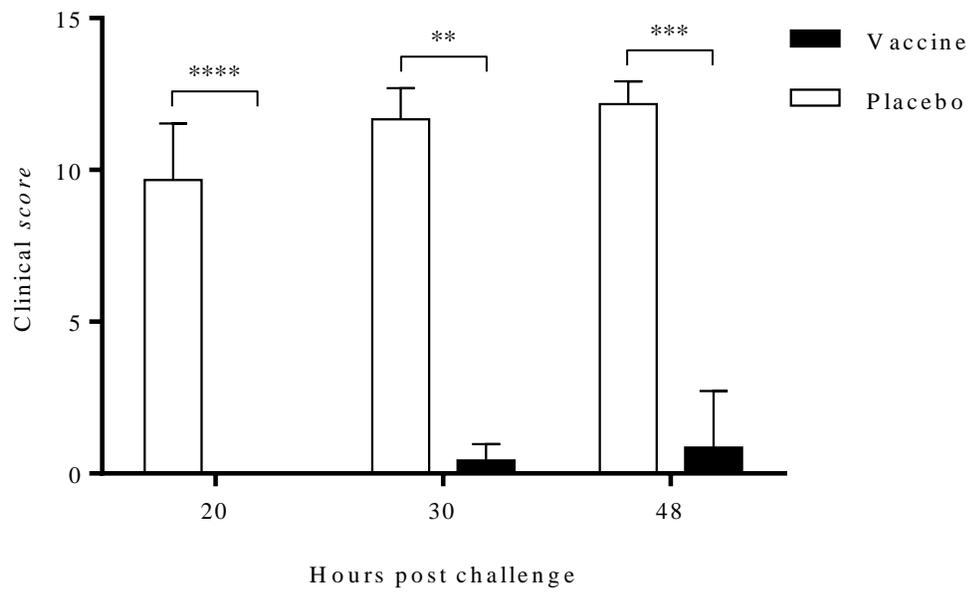
**Figura 15. Detección de IgG1 total en glándula mamaria.** Mediante inmunohistoquímica se cuantificaron los niveles de IgG1 total en glándula mamaria a los 35 días post vacunación. Las fotografías muestran inmunotinciones representativas de ambos grupos, contrastadas con Hematoxilina. (a) Glándula no infectada, grupo placebo. (b) Glándula infectada, grupo placebo. (c) Glándula no infectada, grupo vacunado. (d) Glándula infectada, grupo vacunado. (e) Niveles de IgG1 total (OD) en glándulas mamarias no desafiadas y desafiadas de ambos grupos experimentales; los resultados son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Barra = 100  $\mu$ m.



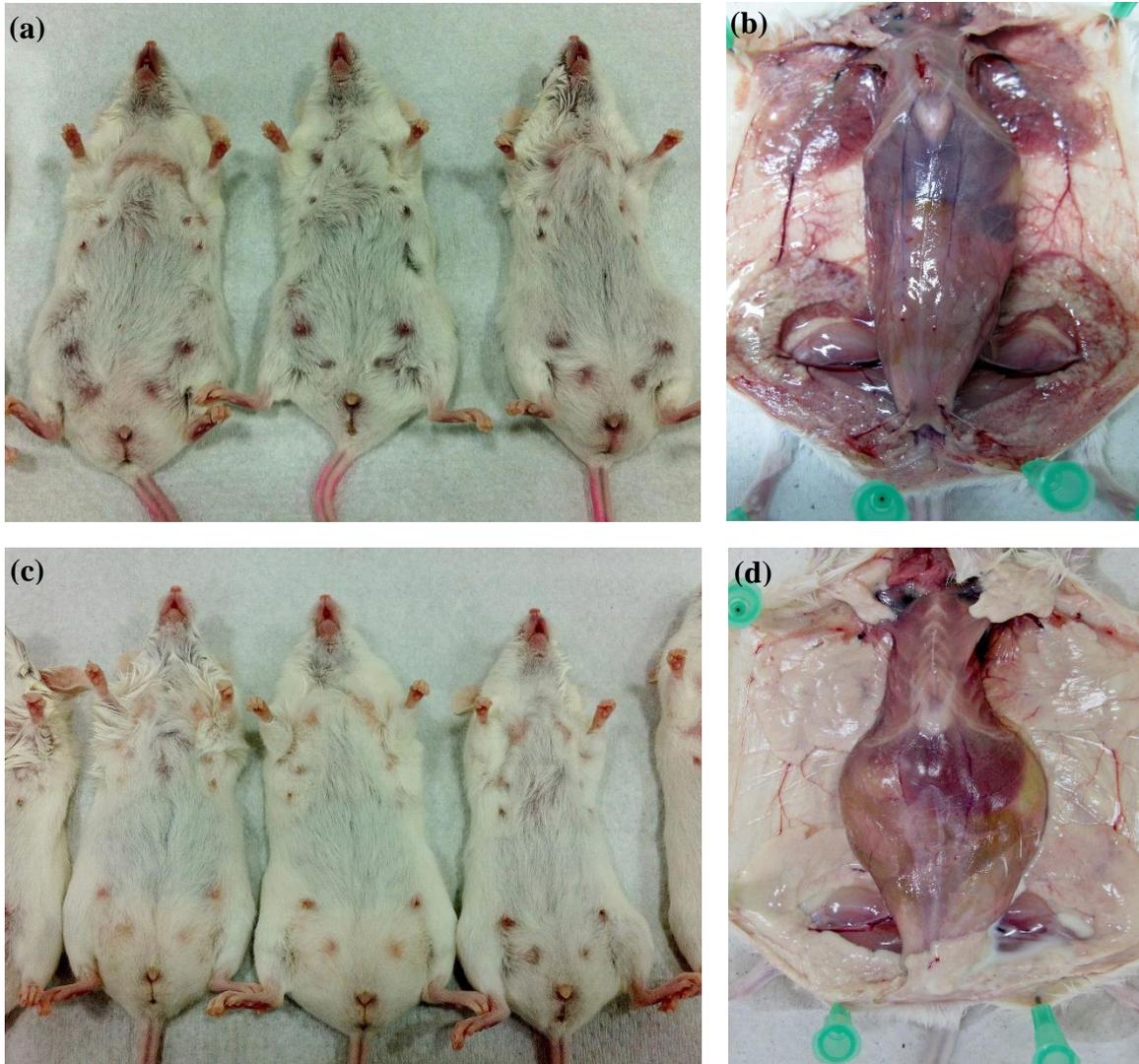
**Figura 16. Detección de IgG2a total en glándula mamaria.** Mediante inmunohistoquímica se cuantificaron los niveles de IgG2a total en glándula mamaria a los 35 días post vacunación. Las fotografías muestran inmunotinciones representativas de ambos grupos, contrastadas con Hematoxilina. (a) Glándula no infectada, grupo placebo. (b) Glándula infectada, grupo placebo. (c) Glándula no infectada, grupo vacunado. (d) Glándula infectada, grupo vacunado. (e) Niveles de IgG2a total (OD) en glándulas mamarias no desafiadas y desafiadas de ambos grupos experimentales; los resultados son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Barra = 100  $\mu$ m.



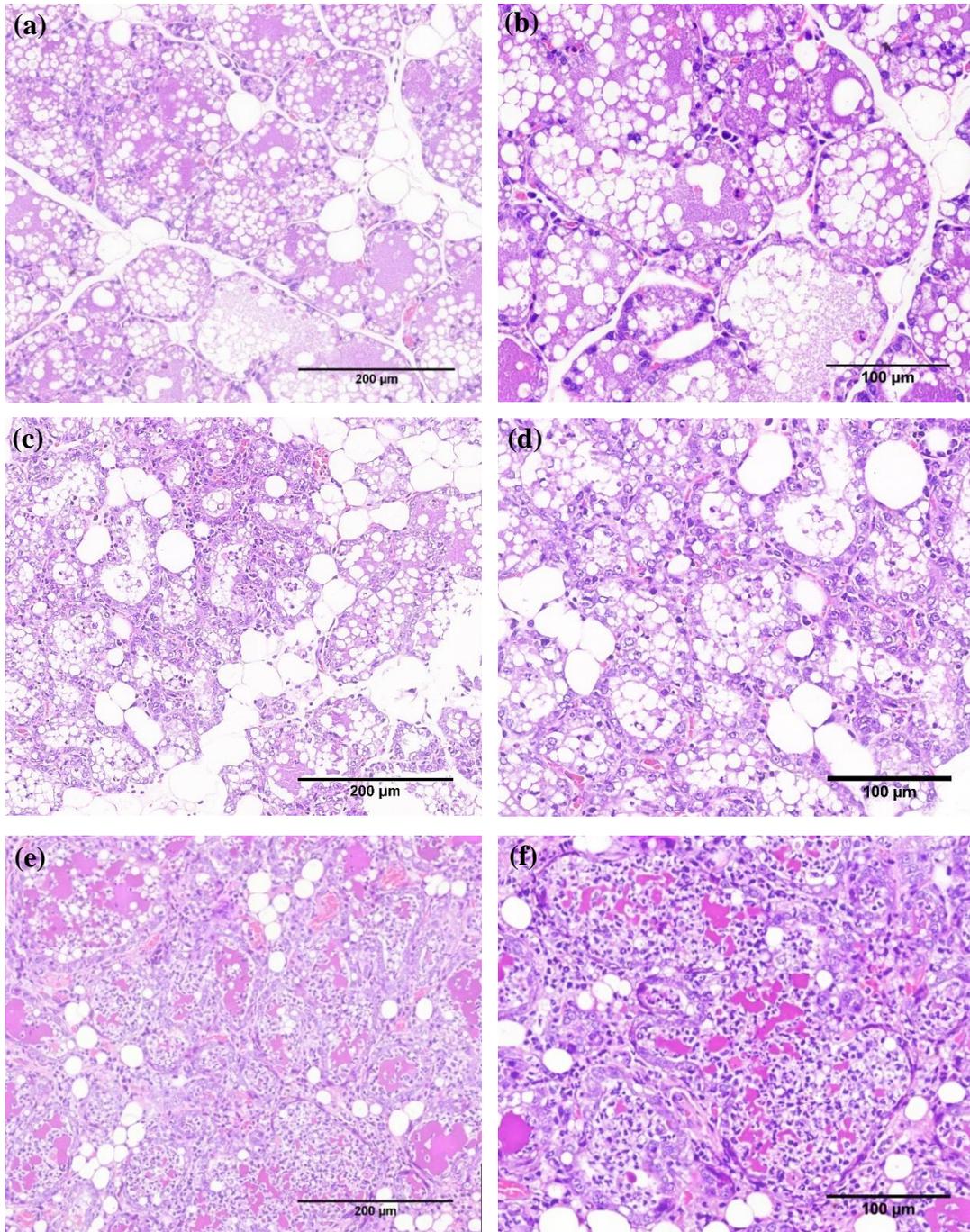
**Figura 17. Análisis bacteriológico cuantitativo de glándulas mamarias.** Bacteriología cuantitativa, expresada como recuento bacteriano por gramo de tejido mamario en base logarítmica ( $\log_{10}$  UFC/g). Las líneas horizontales dentro de cada caja indican la mediana grupal, mientras las cruces indican el promedio aritmético grupal. Bigotes = mínimo–máximo.  $** P = 0,001$ .



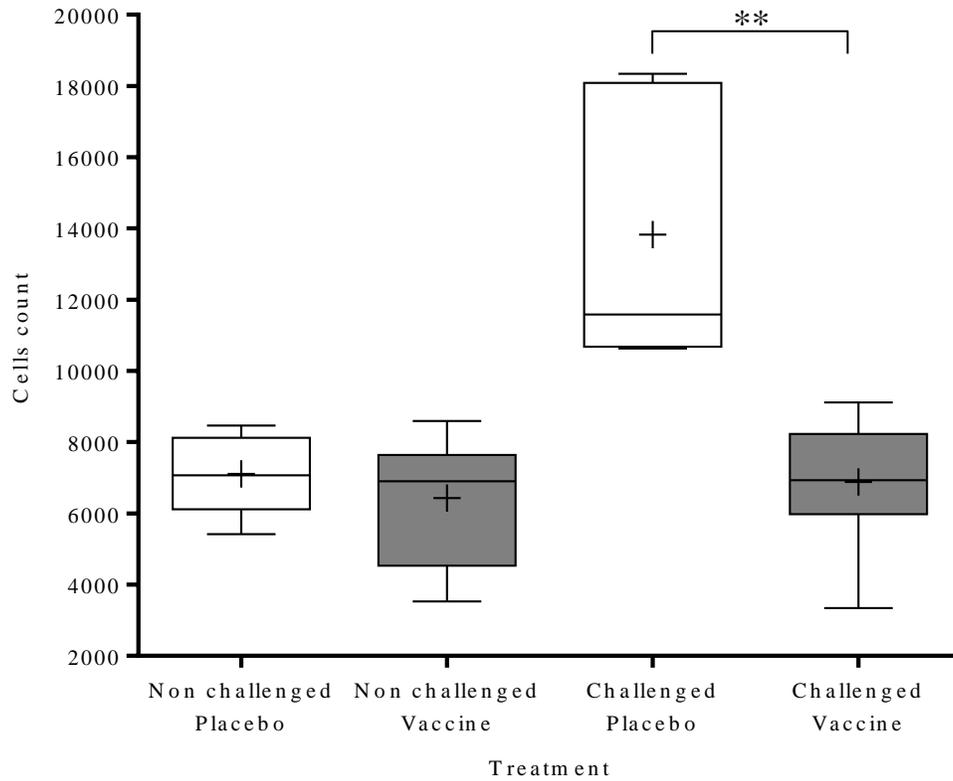
**Figura 18. Score clínico post desafío bacteriano.** Tras el desafío bacteriano, las ratonas fueron observadas y categorizadas en base a un protocolo de evaluación clínica (Anexo 2) a las 20, 30 y 48 horas. Los resultados del *score* clínico grupal son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ; \*\*\*  $P = 0,0001$ ; \*\*  $P < 0,001$ .



**Figura 19. Lesiones macroscópicas al examen *post mortem*.** (a) Ratonas del grupo placebo, en la cuales se observa aumento de volumen y oscurecimiento del tejido mamario y zona abdominal. (b) Internamente, las ratonas del grupo placebo muestran un notorio aumento de volumen del parénquima mamario, edema, congestión marcada, friabilidad y consolidación; las glándulas no desafiadas también muestran cambios inflamatorios. (c) Ratonas del grupo vacunado, en las cuales no se observan signos inflamatorios externos, excepto congestión en los pezones debido a la inoculación con aguja. (d) Internamente, las ratonas del grupo vacunado no muestran cambios inflamatorios macroscópicos en las glándulas mamarias desafiadas. Las imágenes corresponden a ratonas representativas de cada grupo experimental.



**Figura 20. Lesiones microscópicas del parénquima mamario.** (a y b) Glándula mamaria no desafiada del grupo vacunado: arquitectura mamaria lobulillar y alveolar bien definida, epitelio mamario íntegro y alveolos con secreción exocrina; escasa presencia de células inflamatorias. (c y d) Glándula mamaria desafiada del grupo vacunado: características histológicas similares a glándulas no desafiadas del mismo grupo; infiltración celular leve a moderada, principalmente neutrófilos. (e y f) Glándula mamaria desafiada del grupo placebo: pérdida de la arquitectura glandular clásica, epitelio mamario degradado y alveolos repletos de masiva infiltración de neutrófilos y *debris*. Las imágenes corresponden a secciones representativas de glándulas no desafiadas y desafiadas de ambos grupos experimentales. Tinción = Hematoxilina & Eosina. Imágenes de la izquierda: barra = 200  $\mu\text{m}$ ; imágenes de la derecha: barra = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 21. Recuento de células totales en parénquima mamario.** Mediante *software ImageJ 1,51n* se cuantificó en forma automática el número total de células por campo visual, en las secciones histopatológicas teñidas con Hematoxilina & Eosina de todas las glándulas mamarias bajo estudio. Las líneas horizontales dentro de cada caja indican la mediana grupal, mientras las cruces indican el promedio aritmético grupal. Bigotes = mínimo–máximo. \*\*  $P = 0,0025$ .

## ANEXO 1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Comité de Bioética Animal

Santiago, 27 de abril de 2015

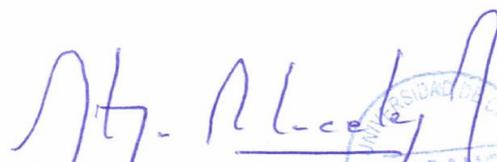
### CERTIFICADO N° 07-2015

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Respuesta inmune y efectividad de una vacuna en base a proteoliposomas de *Escherichia coli* frente a un modelo murino de mastitis clínica”**. Dicho proyecto corresponde a una Tesis financiada a través del Proyecto FIA-PYT-0055-2012, donde el Investigador Responsable será la **M.V. John Quiroga A.** bajo la supervisión del **Dr. Leonardo Sáenz**, y sus detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable trabajará con ratones adquiridos en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y serán manejados de acuerdo a los detalles descritos en el formulario adjunto.

  
Dra. María Sol Morales  
Director Suplente  
Comité de Bioética Animal



  
Dr. Santiago Urcelay V.  
Presidente  
Comite de Bioética Animal



## ANEXO 2

Protocolo de evaluación clínica para ensayo de vacunación y modelo murino de mastitis clínica, basado en Morton y Griffiths, 1985 (*Vet. Record* 116: 431–436).

Variables	Observaciones	Puntos
Aspecto (0 – 3)	- Normal	0
	- Pelo leve–moderadamente hirsuto	1
	- Pelo muy hirsuto. Presencia de secreciones oculares y/o nasales	2
	- Postura anormal (cifótica), claudicación	3
Comportamiento espontáneo (0 – 3)	- Normal	0
	- Pequeños cambios	1
	- Inactividad	2
	- Automutilación, vocalizaciones anormales, animales muy inquietos o inmóviles	3
Comportamiento en respuesta a la manipulación (0 – 3)	- Normal	0
	- Cambios pequeños	1
	- Cambios moderados	2
	- Animal agresivo o comatoso	3
Respiración (0 – 3)	- Normal	0
	- Incremento ligero en la frecuencia respiratoria	1
	- Incremento moderado ( $\pm$ 30%) en la frecuencia respiratoria	2
	- Incremento marcado ( $\pm$ 50%) en la frecuencia respiratoria, respiración asincrónica	3
Alteraciones mamarias post infección experimental (0 – 3)	- Normal/enrojecimiento del pezón producto de la punción	0
	- Edema leve. Congestión leve.	1
	- Inflamación y congestión moderada. Tejido mamario levemente oscuro.	2
	- Inflamación y congestión marcada. Tejido mamario oscuro y endurecido.	3
<p>Puntuación total _____ (0 a 15).</p> <p><b>Acciones correctivas</b> sugeridas en función de la puntuación obtenida por el grupo/individuo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 0 – 4    Normal.</li> <li>- 5 – 8    Supervisión cuidadosa.</li> <li>- 9 – 12    Sufrimiento intenso. Segregación en jaula individual.</li> <li>- 13 – 15    Sacrificio.</li> </ul>		