



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA), Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL)/Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)*

Tesis presentada para optar por el grado académico de  
Doctora en Ciencias Veterinarias

***"Estudio del mecanismo de acción y eficacia de un compuesto modulador de las respuestas inmunes (Panax ginseng) en glándula mamaria bovina"***

Autora: Méd. Vet. Camila Beccaria

Directora: Dra. Bibiana Dallard

Co-directora: Dra. Celina Baravalle

Esperanza, Santa Fe  
2019



*La ciencia más útil es aquella cuyo fruto  
es el más comunicable.*

*Leonardo da Vinci*  
1452- 1519

*A mamá y papá...*

*...por el esfuerzo que le brindaron a nuestra educación.*

## *Agradezco a...*

*Mis directoras Bibiana Dallard y Celina Baravalle... correctoras impiadosas, fundamentales en este proceso, me enseñaron, me guiaron y sobre todo me cuidaron. Gracias por su inmensa bondad!*

*A Sol Renna... se trabaja con más ánimo viendo cada día a una persona que disfruta de su trabajo y se emociona con cada resultado. Gracias por tanta inspiración!*

*A Luis Calvinho... por ser tan generoso con su saber y su cálido reconocimiento.*

*Al comité de tesis, Dra. Carina Porporatto, Dra. Elina Reinoso y Dr. Eduardo Picco... gracias por el acompañamiento, las correcciones, y los aportes tan valiosos.*

*A Pauli Silvestrini... no hallaré socia mejor ni escudera más leal, te tengo que agradecer tanto que me llevaría otra tesis escribirlo.*

*A Eli, Caro A., Nati V., Caro E., Gisel ... trabajar en equipo es una inestimable ayuda, trabajar con amigas es grandioso... gracias!*

*A mis compañera/os del laboratorio Andre, Anto, Ale, Aye, Belkis, Belu, Carlis, Carlos, Caro, Diego, Emma, Emi, Euge, Facu, Fati, Flor, Gabi, Gonza, Gustavo, Juan, Jud, Kike, Kiki, Lean N, Lean D, Luki, Marce, Marito, Mati, Mauri, Meli, Nati S, Pablito, Silvi, Sofi, Uli, Valen.... por millones de buenísimas causas; trabajo, convivencia y amistad... cuántas cosas hemos vivido, Gracias!*

*A Nati Gareis y Sofi Sacco... por las charlas y risas sanadoras.*

*A Fer Rodrigues que me habló por primera vez de PCR con una pasión arrolladora... aquí me ves amiga, tu pasión contagia.*

*A mis amigas de la vida... por estar en la trinchera junto a mí en los momentos más difíciles.*

*A mi familia mamá, papá, Den y José... por ser la motivación de mi vida.*

*A mi novio Ale, que con su belleza, valentía e inteligencia me muestra día a día el camino.*

*A mis mascotas, Frida y Renu por el acompañamiento durante las largas horas nocturnas.*

*A las autoridades de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja (EAGG) de la UNL, por la buena predisposición y especialmente a Gastón Reibel y José María Copes... por no perder nunca la paciencia!*

*A Marcelo Signorini y Ana Molineri... por la claridad de sus explicaciones en eso que tanto me cuesta; la estadística.*

*A la Universidad Nacional del Litoral, especialmente a mi querida Facultad de Ciencias Veterinarias... que me ha dado tantas oportunidades y alegrías.*

*A Humberto Occhi... por haberme iniciado en este camino, comenzó a ayudarme mucho antes de que yo lo supiera.*

*A Hugo Ortega... por haberme brindado la oportunidad de ser una más en su soñado grupo de trabajo.*

*A CONICET, a ANPCyT y sobre todo al pueblo argentino, por hacer posible con sus aportes el desarrollo científico nacional. Espero de corazón haber estado a la altura.*

*A todos muchas gracias! soy muy afortunada*

# ÍNDICE GENERAL

<i>Abreviaturas utilizadas</i>	I
<i>Índice de figuras</i>	IV
<i>Índice de tablas</i>	VI
<i>Resumen</i>	VII
<i>Abstract</i>	VIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA	2
1.2 MECANISMOS DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA	4
1.2.1 Inmunidad innata	5
1.2.1.1 Células de la inmunidad innata	6
1.2.1.2 Receptores de la inmunidad innata	9
1.2.1.2.1 Vías de señalización de los receptores tipo <i>toll</i>	11
1.2.1.2.2 Citoquinas	14
1.3 INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA	15
1.3.1 Terapia en el periodo de secado	19
1.4 MASTITIS BOVINA	21
1.4.1 Generalidades	21
1.4.2 Principales causantes de mastitis	21
1.4.2.1 Mastitis causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	23
1.4.2.1.1 Internalización de <i>Staphylococcus aureus</i> a las células eucariotas	26
1.4.3 Tratamiento de la enfermedad	27
1.4.4 Importancia económica	29
1.5 MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	30
1.5.1 Moduladores de la respuesta inmune (MRI)	30
1.5.2 Mecanismo de acción de los moduladores de la respuesta inmune	31
1.5.2.1 Inmunomoduladores de acción inespecífica	32
1.5.2.2 Inmunomoduladores de acción específica	32
1.5.3 Características de los moduladores de la respuesta inmune	32
1.5.4 Inmunomoduladores en glándula mamaria bovina	33
1.5.5 <i>Panax ginseng</i> como modulador de la respuesta inmune	34

1.5.5.1 Propiedades de <i>Panax ginseng</i>	35
1.5.5.2 Mecanismo de acción de las saponinas	35
1.5.5.3 Antecedentes de <i>Panax ginseng</i> como inmunomodulador	36
1.5.5.3.1 Efecto inmunoprotector de <i>Panax ginseng</i> en un modelo murino de infección intramamaria	38
1.5.5.3.2 Antecedentes de la inoculación intramamaria de <i>Panax ginseng</i> en bovinos	38
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
2.1 HIPÓTESIS GENERAL	41
2.2 OBJETIVO GENERAL	41
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>43</b>
3.1 PREPARACIÓN DE <i>Panax ginseng</i>	44
3.2 CULTIVOS CELULARES	44
3.2.1 Células epiteliales	44
3.2.2 Macrófagos	45
3.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	45
3.4 CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR <i>Panax ginseng</i>	46
3.4.1 Diseño experimental	46
3.4.2 Determinación de los niveles de expresión génica de receptores TLR2 y TLR4, NF- $\kappa$ B, y citoquinas (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) por PCR en tiempo real	47
3.4.2.1 Extracción de ARN total de células eucariotas	47
3.4.2.2 Obtención de ADNc mediante transcripción reversa (RT)	47
3.4.2.3 Diseño de cebadores bovinos	48
3.4.2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa de punto final (PCR)	49
3.4.2.5 Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (Real time)	50
3.4.3 Cuantificación de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4) por inmunoensayo enzimático (ELISA)	52
3.4.4 Determinación intracelular de IL-4 por citometría de flujo	53
3.5 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE TLR2 y TLR4	54
3.5.1 Cultivos celulares	54

3.5.2 Ensayos de viabilidad celular _____	54
3.5.3 Ensayos para la puesta a punto de la metodología de silenciamiento génico en macrófagos bovinos mediante siARN _____	56
3.5.3.1 Retrotranscripción y Reacción en cadena de la Polimerasa _____	56
3.5.3.1.1 Determinación de la concentración adecuada de siARN _____	57
3.5.3.1.2 Evaluación del siControl negativo adecuado y el tiempo de silenciamiento _____	57
3.5.3.1.3 Silenciamiento génico y tratamiento con <i>Panax ginseng</i> _____	57
3.6 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA INTERNALIZACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> A MAC-T _____	58
3.6.1 Preparación de los inóculos _____	58
3.6.2 Curvas de crecimiento bacteriano _____	59
3.6.3 Ensayos de internalización _____	60
3.7 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS _____	61
3.7.1 Ensayos de fagocitosis _____	61
3.7.1.1 Selección de la población de macrófagos y análisis de la fagocitosis ____	62
3.7.2 Producción de especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) _____	62
3.7.3 Producción de óxido nítrico (ON) _____	63
3.8 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE <i>Panax ginseng</i> MEDIANTE PRUEBAS DE CAMPO _____	64
3.8.1 Ensayos de microdilución en caldo _____	64
3.8.1.1 Preparación del inóculo _____	64
3.8.1.2 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la cefalexina _____	65
3.8.1.3 Concentración Bactericida Mínima (CBM) de la cefalexina _____	66
3.8.2 Ensayos de eficacia de <i>Panax ginseng</i> mediante pruebas de campo _____	66
3.8.2.1 Animales _____	66
3.8.2.2 Diseño experimental _____	67
3.8.2.2.1 Toma y procesamiento de muestras _____	67
3.8.2.2.2 Procedimiento de aplicación intramamaria _____	68
3.8.2.3 Aislamiento e identificación de microorganismos _____	69
3.8.2.4 Diagnóstico de infecciones intramamarias y análisis estadístico ____	69
3.8.3.5 Recolección de datos de producción de leche individual y recuento de células somáticas _____	70

<b>4. RESULTADOS</b>	72
4.1 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR	73
4.1.1 Efecto sobre la viabilidad de MAC-T	73
4.1.2 Efecto sobre la viabilidad de macrófagos	73
4.2 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA EN MAC-T Y MACRÓFAGOS	74
4.2.1 Confirmación de tamaño de productos de qRT-PCR	74
4.2.2 Niveles de expresión génica de TLR4 y NF- $\kappa$ B en MAC-T	74
4.2.3 Niveles de expresión génica de TLR2, TLR4 y NF- $\kappa$ B en macrófagos	76
4.2.4 Niveles de expresión génica de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en MAC-T	77
4.2.5 Niveles de expresión génica de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en macrófagos	78
4.2.6 Niveles proteicos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4 en MAC-T	80
4.2.6.1 Producción intracelular de IL-4 en MAC-T	81
4.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE TLR2 Y TLR4	83
4.3.1 Efecto de siARNs sobre la viabilidad celular	83
4.3.2 Determinación de la concentración de siARN	83
4.3.3 Evaluación del siControl negativo adecuado y el tiempo de silenciamiento	85
4.3.4 Silenciamiento génico y tratamiento con <i>Panax ginseng</i>	86
4.4 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>S. aureus</i> IN VITRO	87
4.5 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA INTERNALIZACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> A MAC-T	89
4.6 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS	90
4.6.1 Selección de la población de macrófagos y análisis de la fagocitosis	90
4.6.2 Activación de macrófagos: producción de especies reactivas de oxígeno	90
4.6.3 Activación de macrófagos: producción de óxido nítrico	92
4.7 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE <i>Panax ginseng</i> MEDIANTE PRUEBAS DE CAMPO	93
4.7.1 Evaluación del efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima de la cefalexina	93
4.7.1.1 Concentración inhibitoria mínima de la cefalexina	93
4.7.1.2 Concentración bactericida mínima de la cefalexina	94

4.7.2 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre infecciones intramamarias de vacas en producción al inicio del periodo de secado _____	96
4.7.2.1 Datos descriptivos de distribución de cuartos mamarios sanos e infectados al inicio del periodo de secado _____	96
4.7.2.2 Datos descriptivos de distribución de cuartos mamarios sanos e infectados al pos parto _____	98
4.7.2.3 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre las infecciones intramamarias _____	99
4.7.2.4 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre las infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i> _____	100
4.7.2.5 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre las infecciones intramamarias por SCN__	101
4.7.2.6 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre las infecciones intramamarias por patógenos ambientales _____	102
4.7.2.7 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre las infecciones intramamarias por patógenos contagiosos _____	102
4.7.3 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre la producción de leche y el recuento de células somáticas en la lactancia posterior al tratamiento _____	103
<b>5. DISCUSIÓN _____</b>	<b>105</b>
5.1 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE MAC-T Y MACRÓFAGOS _____	106
5.2 MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE MAC-T Y MACRÓFAGOS POR <i>Panax ginseng</i> _____	106
5.2.1 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre los niveles de expresión génica de receptores <i>toll</i> y NF- $\kappa$ B en MAC-T y macrófagos _____	107
5.2.2 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre los niveles de expresión génica de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ y niveles proteicos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4 en MAC-T _____	110
5.2.3 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre los niveles de expresión génica de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en macrófagos _____	112
5.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE TLR2 Y TLR4 _____	113
5.4 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Staphylococcus aureus</i> _____	116
5.5 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA INTERNALIZACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> A MAC-T _____	116

5.6 EFECTO DE <i>Panax ginseng</i> SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS _____	119
5.7 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE <i>Panax ginseng</i> EN VACAS EN PRODUCCIÓN AL INICIO DEL PERIODO DE SECADO _____	122
5.7.1 Evaluación de la interacción de <i>Panax ginseng</i> con el antimicrobiano _____	122
5.7.2 Eficacia de <i>Panax ginseng</i> sobre infecciones intramamarias de vacas en producción al inicio del secado _____	125
5.7.3 Efecto de <i>Panax ginseng</i> sobre la producción de leche y el recuento de células somáticas en la lactancia posterior al tratamiento _____	132
<b>6. CONCLUSIONES _____</b>	<b>135</b>
6.1 Efecto inmunomodulador de <i>Panax ginseng</i> en cultivos de células bovinas _____	136
6.2 Eficacia de <i>Panax ginseng</i> en pruebas de campo _____	137
<b>7. BIBLIOGRAFÍA _____</b>	<b>138</b>
<b>8. ANEXO I _____</b>	<b>138</b>
<b>9. ANEXO II _____</b>	<b>138</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Ag	Antígeno
ANOVA	Análisis de varianza
AP1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina de suero bovino
CBM	Concentración bactericida mínima
CD	Células dendríticas
CEF	Factor estimulante de colonias
CEM	Células epiteliales mamarias
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLR	Receptores de lectina tipo C
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Células presentadoras de antígeno
CSF	Factores estimulantes de colonias
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidades ópticas
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Inmunoensayo enzimático
ERK	Quinasas reguladoras de señales extracelulares
Fn	Fibronectina
GLM	<i>General lineal model</i>
GM	Glándula mamaria
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
hs	horas
HSPs	<i>Heat shock proteins</i>
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IFN	Interferón
IGF	Factor de crecimiento análogo a insulina
Ig	Inmunoglobulina
IIM	Infecciones intramamarias
IL	Interleuquina
IM	Intramamario
JNK	Proteínas quinasas c-jun N-terminal

<b>KDa</b>	KiloDalton
<b>Lf</b>	Lactoferrina
<b>LPMN</b>	Leucocitos polimorfonucleares
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT</b>	Linfocitos T
<b>LTA</b>	Ácido lipoteicoico
<b>MAC-T</b>	<i>Transformed mammary epithelial cells</i>
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MDP</b>	Muramil dipéptido
<b>Mg</b>	Miligramos
<b>M-H</b>	Mueller hinton
<b>MIF</b>	Inhibidor de la migración
<b>MIN</b>	Minutos
<b>ML</b>	Militros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>MRI</b>	Moduladores de la respuesta inmune
<b>MRSA</b>	<i>S. aureus</i> resistentes a la meticilina
<b>MSCRAMMs</b>	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
<b>MyD88</b>	Factor de diferenciación mieloide
<b>NCCLS</b>	<i>Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests</i>
<b>NF-κB</b>	Factor de transcripción nuclear-kappa B
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>NLRs</b>	Receptores de tipo NOD
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>p-38MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos p-38
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>pg</b>	Picogramo
<b>PG</b>	<i>Panax ginseng</i>
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de patrón
<b>pt</b>	Post tratamiento
<b>Rb1/Rg1</b>	Ginsenósido Rb1/Rg1
<b>RCS</b>	Recuento de células somáticas
<b>RHD</b>	<i>Rel homology domain</i>
<b>RLRs</b>	Receptores de ácido retinoico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b><i>S. agalactiae</i></b>	<i>Streptococcus agalactiae</i>

<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo
<b>SCV</b>	<i>Small colony variants</i>
<b>seg</b>	segundos
<b>SRCR</b>	<i>Scavenger receptor cysteine-rich</i>
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante-beta
<b>TLRs</b>	Receptores tipo <i>toll</i>
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TSC</b>	Tripteína soya caldo
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Microgramo
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	Microlitro
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Micromolar

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Ubre bovina. _____	2
<b>FIGURA 2.</b> Morfología general de la glándula mamaria bovina. _____	3
<b>FIGURA 3.</b> Señalización intracelular de los TLRs. _____	12
<b>FIGURA 4.</b> Fases de la involución de la GM. _____	16
<b>FIGURA 5.</b> Planta de <i>Panax ginseng</i> . _____	35
<b>FIGURA 6.</b> Obtención de muestra de leche previo al tratamiento (1). Aplicación IM del tratamiento (2). _____	68
<b>FIGURA 7.</b> Representación gráfica del diagnóstico de IIM y curas bacteriológicas _____	70
<b>FIGURA 8.</b> Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de PG sobre la viabilidad de MAC-T durante 2, 8 y 24 horas. _____	73
<b>FIGURA 9.</b> Efecto del tratamiento durante 24 hs con diferentes concentraciones de PG sobre la viabilidad de macrófagos. _____	74
<b>FIGURA 10.</b> Expresión génica relativa de TLR4 (A) y NF- $\kappa$ B (B) en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG durante 2, 6, 12 y 24 hs. _____	75
<b>FIGURA 11.</b> Expresión génica relativa de TLR2 (A), TLR4 (B) y NF- $\kappa$ B (C) en macrófagos tratados con PG durante 2, 6, 12 y 24 hs. _____	76
<b>FIGURA 12.</b> Expresión génica relativa de IL-6 en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG a las 2, 6, 12 y 24 hs de tratamiento. _____	78
<b>FIGURA 13.</b> Expresión génica relativa de IL-6 (A), IL-8 (B), TNF- $\alpha$ (C) e IL-1 $\beta$ (D) en macrófagos tratados con PG a las 2, 6, 12 y 24 hs post tratamiento. _____	79
<b>FIGURA 14.</b> Niveles proteicos de IL-6 (A) e IL-4 (B) en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG durante 2, 6, 12, y 24 hs para IL-6, y durante 24 hs para IL-4. _____	81
<b>FIGURA 15.</b> Producción intracelular de IL-4 en MAC-T. _____	82

<b>FIGURA 16.</b> Efecto del tratamiento con 75 nM de siARN TLR2, siARN TLR4, siControl negativo (1), siControl negativo (2) sobre la viabilidad de macrófagos durante 48 horas. _____	83
<b>FIGURA 17.</b> Porcentajes de expresión génica de TLR2 y TLR4 relativa al control (basal) en macrófagos tratados con diferentes concentraciones de siARN y siControl negativo (1) durante 48 hs. _____	84
<b>FIGURA 18.</b> Porcentajes de expresión génica de TLR2 y TLR4 relativa al control (basal) en macrófagos tratados con 75 nM de siARN y siControl negativo (1 y 2) durante 24 hs. _____	85
<b>FIGURA 19.</b> Porcentajes de expresión génica de TLR2 y TLR4 relativa al control (basal) en macrófagos silenciados con siARNs y tratados con 3 mg/ml de PG durante 24 hs. _____	87
<b>FIGURA 20.</b> Efecto de PG sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> cepa Newbould 305 (A) y cepa 5011 (B) en caldo con pH normal, hasta las 24 hs. ____	88
<b>FIGURA 21.</b> Efecto de PG sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> cepa Newbould 305 (A) y cepa 5011 (B) en caldo con pH modificado, hasta las 24 hs. _____	88
<b>FIGURA 22.</b> Efecto de diferentes concentraciones de PG sobre la internalización de las cepas Newbould (A) y 5011 (B) de <i>S. aureus</i> a las MAC-T. _____	89
<b>FIGURA 23.</b> Efecto de PG sobre la producción de ON en sobrenadantes de macrófagos co-cultivados con las cepas Newbould 305 (A) y 5011 (B) de <i>S. aureus</i> . _____	92
<b>FIGURA 24.</b> Efecto de PG sobre la producción de leche y el RCS en vacas tratadas al secado con cefalexina y PG + cefalexina durante la lactancia siguiente al tratamiento. _____	104

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Cebadores utilizados para determinar niveles de expresión génica de receptores y citoquinas de la inmunidad innata. _____	49
<b>TABLA 2.</b> siARNs y siControl negativo (1 y 2) utilizados en los ensayos de silenciamiento génico de receptores tipo <i>Toll</i> . _____	55
<b>TABLA 3.</b> Efecto de PG sobre la actividad fagocítica y producción de ROS en macrófagos aislados de secreción mamaria. _____	91
<b>TABLA 4.</b> Promedio de los valores $DO_{600nm} \pm$ desvío estándar de los diferentes tratamientos y concentraciones de cefalexina, utilizando la cepa de referencia de <i>S. aureus</i> (ATCC 29213). _____	95
<b>TABLA 5.</b> Promedio de los valores $DO_{600nm} \pm$ desvío estándar de los diferentes tratamientos y concentraciones de cefalexina, utilizando la cepa 17 de <i>S. aureus</i> . _____	95
<b>TABLA 6.</b> Porcentajes de cuartos mamarios sanos e infectados tratados con cefalexina y PG + cefalexina al secado _____	96
<b>TABLA 7.</b> Porcentajes de los diferentes microorganismos aislados a partir de cuartos mamarios infectados al momento del secado previo al tratamiento con cefalexina y PG + cefalexina. _____	97
<b>TABLA 8.</b> Porcentajes de cuartos mamarios sanos e infectados tratados con cefalexina y PG + cefalexina al pos parto. _____	98
<b>TABLA 9.</b> Porcentajes de los diferentes microorganismos aislados a partir de cuartos mamarios infectados al pos parto luego del tratamiento con cefalexina y PG + cefalexina. _____	99

## RESUMEN

El uso de compuestos moduladores de la respuesta inmune (MRI) frente a infecciones intramamarias (IIM) en bovinos, constituye una alternativa a los tratamientos tradicionales con antibióticos durante la involución mamaria. El objetivo general fue estudiar los efectos de un extracto de *Panax ginseng* (PG) como MRI y esclarecer su mecanismo de acción *in vitro* en cultivos de células bovinas. Asimismo, se evaluó la eficacia del compuesto, en combinación con cefalexina, para eliminar y prevenir nuevas IIM durante el periodo de involución mamaria y su efecto sobre la producción de leche en la lactancia siguiente. En células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T), PG estimuló la expresión génica y proteica de interleuquina (IL)-6 a las 12 y 24 hs post tratamiento (pt) y de IL-4 a las 24 hs pt. En macrófagos bovinos, PG estimuló la expresión génica del receptor tipo *toll* (TLR)4 y el factor de transcripción nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) a las 12 y 24 hs pt. Se detectó un efecto significativo del tratamiento con PG y del tiempo de exposición sobre IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , observándose los mayores niveles de expresión a las 12 y 24 hs pt. En MAC-T, PG redujo en forma significativa la internalización de dos cepas de *Staphylococcus aureus*. En macrófagos, la capacidad fagocítica y los niveles de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, no se vieron influenciados por PG. Las pruebas de campo demostraron que la eficacia de PG + cefalexina como terapia de secado fue similar a la terapia con cefalexina, no observándose efectos adversos aparentes con la combinación del MRI y el antimicrobiano. Las tasas de nuevas IIM al pos parto de los animales tratados con PG + cefalexina fueron similares a las detectadas con cefalexina, demostrándose un efecto preventivo similar. El tratamiento intramamario con PG + cefalexina no tuvo efectos negativos sobre la producción de leche y el recuento de células somáticas. Este trabajo aporta nuevos conocimientos acerca de los efectos de PG como potencial MRI en glándula mamaria bovina, aunque son necesarias pruebas de eficacia a mayor escala a los fines de promover el desarrollo de nuevos productos y su transferencia tecnológica al sector lácteo.

## ABSTRACT

The use of modulators of the immune response (MRI) against intramammary infections (IMI) in dairy cattle is an alternative to traditional treatments with antibiotics during mammary involution. The general objective was to study the effects of *Panax ginseng* (PG) extract as MRI and to clarify its mechanism of action *in vitro* in bovine cells culture. In addition, the efficacy of the compound, in combination with cephalexin, was evaluated to eliminate and prevent new IMI during mammary involution and its effect on milk production in the following lactation. In bovine mammary epithelial cells (MAC-T), PG stimulated the gene and protein expression of interleukin (IL)-6 at 12 and 24 h post treatment (pt) and IL-4 at 24 hs pt. In bovine macrophages, PG stimulated the gene expression of *toll* like receptor (TLR)4 and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) at 12 and 24 hs pt. A significant effect of the treatment with PG and the time of exposure were detected on IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , observing the highest levels of expression at 12 and 24 hs pt. In MAC-T, PG reduced the internalization of two *Staphylococcus aureus* strains. In macrophages, the phagocytic capacity and levels of reactive oxygen species and nitric oxide were not influenced by PG. The results of the field trials showed that the efficacy of the treatment with PG + cephalexin as drying therapy was similar to the therapy with cephalexin, not observing apparent adverse effects with the combination of the MRI and the antimicrobial. The rates of new postpartum IMI of the animals treated with PG + cephalexin were similar to those detected with cephalexin, demonstrating a similar preventive effect. Intramammary treatment with PG + cephalexin had no negative effects on milk production or somatic cell count. This work provides new knowledge about the effects of PG as a potential MRI in bovine mammary gland, although evidence of efficacy on a larger scale tests are needed in order to promote the development of new products and its technological transfer to the dairy sector.

## 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA

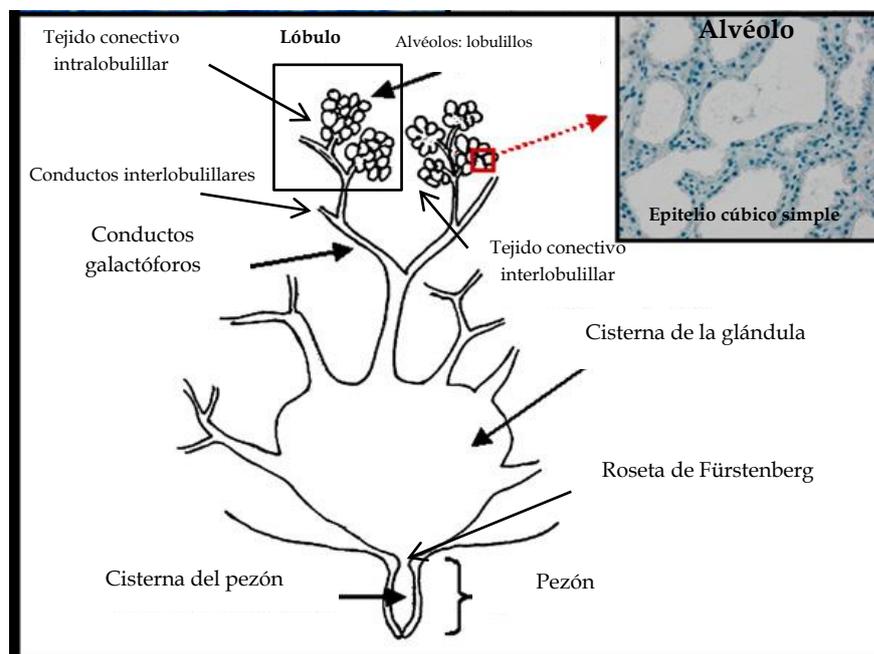
La ubre bovina está constituida por cuatro glándulas mamarias o “cuartos”. Cada cuarto es una unidad funcional en sí misma que opera en forma independiente de las demás. A su vez, cada glándula posee un pezón que se abre al exterior a través de un conducto único (Figura 1).



FIGURA 1. Ubre bovina.

En cuanto a la histología, la glándula mamaria (GM) bovina es una glándula túbulo-alveolar compuesta, de origen cutáneo. Cada glándula consiste en un epitelio secretor rodeado por un estroma de tejido conectivo subcutáneo con mayor o menor abundancia de tejido adiposo. Los conductos colectores de la glándula desembocan en la superficie de la piel por medio del pezón (Gasque Gómez, 2008). El sistema colector consiste en conductos ramificados que terminan en conductillos de secreción y, cuando la glándula se encuentra en actividad, en alvéolos. El conjunto de alvéolos conforman un lobulillo y cada alvéolo se separa de sus vecinos por medio de tejido conectivo intralobulillar. A su vez, los lobulillos forman lóbulos, los cuales están limitados por tejido conectivo interlobulillar. Cada alvéolo está revestido por una capa de epitelio cúbico simple en el estadio no secretor o de reposo. Células mioepiteliales contráctiles que presentan numerosas prolongaciones, rodean el epitelio de los conductos y los alvéolos, y una membrana basal continua encierra todo el sistema epitelial (Dellman, 1994) (Figura 2).

El tejido conjuntivo que rodea cada lobulillo es denso y contiene conductos interlobulillares, vasos sanguíneos y linfáticos mayores. Numerosos conductos interlobulillares drenan en un conducto galactóforo que es el único conducto excretor del lóbulo. Varios conductos galactóforos drenan en la cisterna de la glándula. Cada cisterna de la glándula está ubicada en la base de cada pezón, y es la encargada de almacenar leche en los intervalos entre ordeños. Desde la cisterna de la glándula emerge un conducto ensanchado, que atraviesa longitudinalmente al pezón, denominado seno o cisterna del pezón. Entre la cisterna de la glándula y la del pezón se encuentra un pliegue anular de mucosa, que contiene un círculo venoso, denominado comúnmente roseta de Fürstenberg, que junto con el esfínter del pezón evitan la salida pasiva de leche y la entrada de gérmenes y sustancias extrañas al interior de la GM (Dellmann, 1994; Bragulla y col., 2003) (Figura 2).



**FIGURA 2.** Morfología general de la glándula mamaria bovina.  
Adaptado de Capuco y Ellis (2005).

## 1.2 MECANISMOS DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA

El sistema de defensa de la GM bovina está mediado por factores inmunológicos innatos y adquiridos asociados a este tejido, que actúan en forma coordinada, siendo la eficiencia de estos mecanismos determinante de la resistencia a nuevas infecciones intramamarias (IIM) (Rainard y Riollet, 2006; Shuckken y col., 2011; Sordillo, 2018).

La inmunidad innata constituye la primer línea de defensa durante las etapas tempranas de la interacción con el organismo, siendo el factor clave determinante del establecimiento, progresión y gravedad de la infección, así como del desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Aitken y col., 2011). Algunos mecanismos de defensa innatos preexisten en la GM, mientras que otros se activan rápidamente después de la exposición al organismo y sus productos. Dependiendo de la eficiencia de estos mecanismos, los patógenos pueden ser eliminados en cuestión de minutos u horas después de la invasión. Si esto ocurre, no se producirán cambios notables en la función de la GM o en la calidad de la leche (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Los componentes del sistema de defensa innato de la GM incluyen: barreras anatómicas como el esfínter del pezón, barreras químicas como la queratina del canal del pezón, factores solubles como la lactoferrina (Lf), lisozima, proteínas del complemento, citoquinas y quimioquinas. Además, existen elementos celulares que incluyen, macrófagos, células dendríticas (CD), mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y células asesinas naturales (NK: *natural killer*) (Rainard y Riollet, 2006; Sordillo, 2018).

Por otra parte, la inmunidad específica o adaptativa se orquesta en poblaciones celulares que reconocen antígenos particulares de los patógenos y está mediada por anticuerpos y otros factores solubles, linfocitos T y B. Esta respuesta tiene la particularidad de ser más efectiva luego de cada exposición al patógeno y su activación secundaria mediada por linfocitos T y B permitiría la eliminación del mismo (Shuckken y col., 2011; Sordillo, 2018).

En los últimos 15 años, el dogma de la inmunidad innata ha cambiado su condición de inespecífica en virtud del descubrimiento de receptores de reconocimiento de patrones que confieren cierta especificidad al reconocimiento de microorganismos por parte de las células inmunes innatas (Medzhitov y Janeway, 2000; Bowdish y col., 2007; Netea y col., 2017). La inmunidad innata es capaz de generar un tipo de memoria denominada “inmunidad entrenada” y en comparación con la memoria inmunológica clásica, tiene una serie de características particulares. En primer lugar, implica un conjunto de células (células mieloides, células NK, células linfoides innatas) y moléculas efectoras y de reconocimiento, diferentes de aquellas involucradas en la memoria inmunológica clásica. En segundo lugar, y en contraste con la memoria inmunológica clásica que depende de la reorganización genética y la proliferación de clones de linfocitos específicos de antígeno, la respuesta incrementada a estímulos secundarios durante la inmunidad entrenada no es específica para un patógeno particular y está mediada por señales que afectan factores de transcripción y reprogramación epigenética. Finalmente, la inmunidad entrenada se basa en un estado funcional alterado de las células inmunes innatas que persiste durante semanas o meses, en lugar de años, después de la eliminación del estímulo inicial (Netea y col., 2017).

Los avances tecnológicos en inmunología han provisto de nuevas herramientas de investigación que facilitan el estudio de la inmunidad de la GM bovina y la patogénesis de enfermedades. Como consecuencia, se tiene un mayor entendimiento del sistema de defensa de la GM bovina y su función en la prevención de las mismas (Wellnitz y Bruckmaier, 2012; Sordillo, 2018).

### **1.2.1 Inmunidad innata**

La inmunidad innata de la GM bovina está conformada, en primer lugar, por barreras naturales anatómicas, físicas y químicas. La integridad de estas barreras impide la penetración de patógenos y además contribuyen a la inmunidad antimicrobiana mediante la producción de sustancias

microbiostáticas y microbicidas. Si estas barreras son superadas, se establece un foco infeccioso primario y a fin de hacerle frente, el sistema innato pone en marcha tanto mecanismos celulares como humorales, produciendo una respuesta inflamatoria local mediada principalmente por macrófagos, neutrófilos, células NK y citoquinas (Sordillo, 2018).

Una respuesta inmune rápida y efectiva se basa en el reconocimiento precoz de los patógenos potenciales (Akira y col., 2006). Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR: *Pattern Recognition Receptors*) específicos, en la superficie o dentro de las células del hospedador, se unen a moléculas particulares de los microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Estos patrones moleculares constituyen un conjunto de moléculas conservadas y compartidas por grupos diversos de microorganismos y están presentes en su superficie o se liberan cuando los mismos se replican o degradan (Takeda y Akira, 2005). Los PRR son expresados por los leucocitos de la leche y por las células epiteliales que recubren la GM (Strandberg y col., 2005).

#### **1.2.1.1 Células de la inmunidad innata**

Las células del sistema inmune innato realizan varias funciones que son esenciales para la defensa contra los microorganismos. Algunas de estas funciones son: barreras anatómicas, producción de citoquinas, activación de la respuesta inmune adaptativa, entre otras. Si el microorganismo atraviesa con éxito la barrera epitelial se encuentra con células de la inmunidad innata que desencadenan una reacción inflamatoria caracterizada por un incremento en las células somáticas de la leche (revisado por Paape y Capuco, 1997 y Wellnitz y Bruckmaier, 2012), las cuales están representadas principalmente por células epiteliales exfoliadas y leucocitos inmunocompetentes como macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (Bruckmaier y Wellnitz, 2017)

Las **células epiteliales mamarias (CEM)** que revisten el canal del pezón, la cisterna de la glándula y los alvéolos constituyen en conjunto las primeras

células que reconocen a los patógenos y participan en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Tienen un rol clave en el reconocimiento patogénico y en el inicio y desarrollo del proceso inflamatorio, sintetizan y secretan citoquinas, quimioquinas y proteínas de fase aguda (Rainard y Riollet, 2006). Las citoquinas que secretan pueden ser de tipo 1 como, interleuquina (IL)-12, interferón (IFN)- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o del tipo 2 como IL-4, IL-13 e IL-5, dependiendo del estado de diferenciación promovido por hormonas lactogénicas (prolactina, dexametasona e insulina) (Khaled y col., 2007; Watson, 2009; Günther y col., 2011). Además las CEM, tienen la capacidad de engullir a células epiteliales apoptóticas y contribuir a la remoción tisular de la GM durante el periodo de involución (Monks y col., 2005, 2008).

Los **macrófagos** son el tipo celular predominante en la leche de vacas sanas (Sarikaya y col., 2006), en particular, en la fracción de leche de la cisterna (es decir, cerca del punto de entrada potencial de los patógenos). Son células con alta capacidad fagocítica, que presentan además, gran capacidad microbiostática y microbicida (Fainboim y Geffner, 2008). Además de la capacidad fagocítica, los macrófagos tienen la habilidad de secretar sustancias que facilitan la migración y actividad de otros tipos celulares, la cual sería la función de mayor importancia en la respuesta innata de la GM (Sordillo y Streicher, 2002).

Asimismo, los macrófagos también juegan un rol en el desarrollo de la respuesta inmune adquirida a través del procesamiento y presentación de antígenos en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II (Sordillo y Streicher, 2002). Los antígenos de bacterias internalizadas son procesados por los macrófagos y luego se localizan en su membrana celular en asociación a las moléculas del CMH-II (moléculas de membrana polimórficas requeridas por los linfocitos para el reconocimiento de antígenos externos) (Fainboim y Geffner, 2008).

Los **neutrófilos** son el tipo de células predominantes durante la inflamación temprana en el tejido mamario. Migran desde la sangre a la GM en respuesta a las sustancias quimiotácticas secretadas por los macrófagos. Esta

rápida movilización desde la sangre hacia la leche es crucial para prevenir la proliferación de bacterias de crecimiento rápido (Bougarn y col., 2010; Elazar y col., 2010).

Los fagocitos (macrófagos y neutrófilos) expresan receptores que reconocen PAMPs y una vez dada la unión microorganismo-receptor, la membrana plasmática comienza a redistribuirse y extiende una prolongación alrededor del microorganismo, formando una vesícula llamada fagosoma, que se fusionará con el lisosoma del fagocito dando lugar al fagolisosoma, lugar donde se darán los mecanismos microbicidas.

Existen tres importantes tipos de mecanismos microbicidas (Abbas y col., 2012):

- Especies reactivas de oxígeno (ROS: *reactive oxygen species*): los fagocitos activados convierten el oxígeno molecular en ROS que son sustancias oxidantes muy reactivas que destruyen microorganismos y otras células. Este proceso se denomina “estallido respiratorio”.
- Óxido nítrico (ON): los macrófagos producen especies reactivas del nitrógeno, que dentro de los fagolisosomas se combinan con peróxido o superóxido de hidrógeno, con poder microbicida.
- Enzimas proteolíticas: los fagocitos activados producen varias enzimas proteolíticas que destruyen microorganismos, entre las más importantes están: elastasa y catepsina G.

Los productos microbicidas de los fagocitos no distinguen entre tejidos propios y microorganismos, como resultado de ello, si estos productos entran en el ambiente extracelular, son capaces de dañar los tejidos (Abbas y col., 2012).

Las **células NK** son linfocitos de gran tamaño y de forma granular que poseen actividades citotóxicas independientes del CMH. Las células NK se unen a células tumorales o infectadas y al degranularse secretan perforinas que destruyen la célula blanco por disrupción de la membrana celular. Si bien los neutrófilos y macrófagos están muy bien preparados para encontrar y eliminar

los patógenos extracelulares, las células NK son críticas al momento de eliminar patógenos intracelulares (Rainard y Riollet, 2006).

Las **células dendríticas (CD)** constituyen una población heterogénea de células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales y son potentes estimuladores de los linfocitos T vírgenes (Th0), estos son activados mediante el reconocimiento de un péptido o antígeno mediante el CMH II, presentado por las CPA mediante la interacción con el receptor de célula T. Después de la activación, las células comienzan a dividirse y/o dan lugar a un clon de células efectoras, cada una específica para el mismo antígeno presentado en el mismo CMH II (Goldsby, 2003). Estas células efectoras son CD4+ y se pueden dividir en cinco subtipos principales, con diferentes fenotipos de secreción de citoquinas que provocan características funcionales únicas para cada tipo: células tipo Th1, Th2, Th17, T regulatorias y T helper foliculares.

Existe escasa información disponible acerca de la distribución de las CD en el tejido mamario bovino, principalmente debido a la dificultad de distinguir estas células de los macrófagos, que poseen un fenotipo similar. Usando inmunohistofluorescencia y una combinación de marcadores (MHC-II, CD205, CD11c), Maxymiv y col. (2012), demostraron que en la GM bovina las CD se localizan dentro del epitelio alveolar y en el tejido conectivo intralobular, postulando un posible rol en la protección de la GM contra patógenos causantes de mastitis.

### **1.2.1.2 Receptores de la inmunidad innata**

La respuesta innata se inicia cuando PRR presentes en la superficie o dentro de las células del hospedador, reconocen PAMPs. Los PRR pueden ser divididos en 5 subgrupos, los receptores de ácido retinoico (RLRs: *RIG-like receptors*), los receptores de tipo NOD, dominio de oligomerización de nucleótidos (NLRs: *NOD-like receptors*), la superfamilia de los receptores "scavenger" o basurero con dominios ricos en cisteína (SRCR: *Scavenger receptor cysteine-rich*), los receptores de lectina tipo C (CLR) y los receptores tipo *toll*

(TLRs: *Toll-like receptors*). Estos últimos han sido los receptores más frecuentemente estudiados en animales de producción (Kawai y Akira, 2010). Los TLRs forman una gran familia de receptores transmembranosos de tipo I que juegan un rol esencial en la inmunidad innata. En los últimos años, se han descrito 10 tipos de TLRs en bovinos (Mc Guire y col., 2006; Werling y col., 2006; Werling y col., 2017).

Los TLRs son glicoproteínas estructuralmente relacionadas que reconocen diferentes PAMPs e inducen la producción de factores secretados como citoquinas (Akira y col., 2006). Están localizados en la membrana plasmática celular o dentro de endosomas (Fu y col., 2013). Presentan un dominio extracelular N-terminal y un dominio intracelular C-terminal, conocido como dominio receptor Toll/IL-1 (TIR), que muestra homología con el receptor de IL-1 (Akira y col., 2006; Medzhitov, 2007; Beutler, 2009). Este dominio es requerido para el reclutamiento de moléculas adaptadoras para la activación de las vías de señalización corriente abajo. Respecto a los ligandos de algunos de estos receptores, el TLR2 reconoce principalmente peptidoglicanos y ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias Gram positivas (Rainard y Riollot, 2006; Akira y col., 2006). Además, reconoce una amplia variedad de componentes a través de una cooperación funcional con varias proteínas que pueden o no estar relacionadas estructuralmente con éste. Se ha demostrado que las células involucradas en la respuesta inflamatoria como monocitos/macrófagos, neutrófilos, CD y mastocitos expresan TLR2 (McCurdy y col., 2003; Sabroe y col., 2003; Esen y col., 2004). El TLR4 reconoce lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas (Rainard y Riollot, 2006). El LPS es un activador inmune muy potente que puede activar a TLR4 a muy baja concentración (Takeda y Akira, 2005). Proteínas extracelulares como fibrinógeno, fibronectina y heparán sulfato se han asociado como ligandos endógenos responsables de la activación de TLR4 (Okamura y col., 2001; Smiley y col., 2001; Termeer y col., 2002; Johnson y col., 2002). Otros ligandos endógenos identificados fueron las  $\beta$ -defensinas y las proteínas de choque térmico (HSPs: *heat shock proteins*) (Asea y col., 2002; Dybdahl y col., 2002; Vabulas y col., 2002). Adicionalmente, los TLR4

también reconocen derivados de plantas y moléculas no patogénicas (Nakaya y col., 2004).

#### **1.2.1.2.1 Vías de señalización de los receptores tipo *toll***

La estimulación de los TLRs dispara la expresión de numerosos genes involucrados en la respuesta inmune. La cascada de eventos que ocurre luego de la interacción TLRs-ligando estimula la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), conduciendo a la producción de importantes mediadores de la inmunidad innata, tales como IL-6, IL-12, IL-18, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Takeda y Akira, 2005).

Según Akira y Takeda (2004), todas las vías de transducción de señales de TLRs activan finalmente la transcripción de NF- $\kappa$ B, un importante regulador de la respuesta inflamatoria en numerosos procesos celulares (Wei y col., 2014a). NF- $\kappa$ B es un dímero constituido por proteínas de la familia Rel, los miembros de esta familia son los encargados de activar la transcripción de los genes blanco de la vía. En cuanto a su estructura, presentan un dominio N-terminal común llamado RHD (RHD: *rel homology domain*), el cual es el responsable de la dimerización de los distintos constituyentes de la familia, de la asociación con el inhibidor I $\kappa$ B y de la unión con los motivos  $\kappa$ B del ADN (Hoffmann y col., 2006). En la mayoría de las células, NF- $\kappa$ B se encuentra en el citosol en forma inactiva, formando homo-y/o heterodímeros. El heterodímero NF- $\kappa$ B p65/p50 es el más abundante en las células de mamíferos (Ghosh y Karin, 2002;). En el citoplasma, NF- $\kappa$ B p50 permanece en forma inactiva debido a su interacción con la proteína inhibidora I $\kappa$ B. En respuesta a un estímulo, se induce la degradación proteolítica de I $\kappa$ B, provocando la activación y translocación de NF- $\kappa$ B p65 al núcleo (Wei y col., 2014a), en donde se une a la región promotora de los genes diana regulando su transcripción mediante la unión de co-activadores o co-represores (Mémet, 2006; Hayden y Ghosh, 2008; Choi y col., 2011).



vía lleva a la activación de los factores de transcripción AP1 (proteína activadora 1) a través de la activación de MAPK. Otra vía activa el complejo TAK1/TAB, que potencia la actividad del complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK). Una vez activado, el complejo IKK induce fosforilación y subsecuente degradación de I $\kappa$ B, lo que resulta en la translocación hacia el núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Akira y Takeda, 2004; Akira y col., 2006) y la consecuente inducción de los genes involucrados en la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios.

Además, en mamíferos, el reconocimiento por parte de los TLR promueve la activación de las proteínas quinasas c-jun N-terminal (JNK), quinasas reguladoras de señales extracelular (ERK) y proteína quinasa activada por mitógenos p-38 (p-38MAPK), lo que culmina en la estimulación de la síntesis de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que en acción coordinada producen respuestas inflamatorias locales y sistémicas. Varios hallazgos han demostrado que MyD88 es esencial para la respuesta inflamatoria mediada por todos los miembros TLRs (Kawai y col., 1999; Takeuchi y col., 2000; Hayashi y col., 2001; Hemmi y col., 2002). El reclutamiento de estos adaptadores dispara distintas vías de señalización que conducen a la translocación hacia el núcleo de factores de transcripción que inducirán la transcripción de citoquinas inflamatorias en respuesta a la unión inicial de los TLRs con sus ligandos (Yamamoto y col., 2004). Se ha determinado que la expresión de citoquinas durante la inflamación de la GM bovina se correlaciona con la activación de NF- $\kappa$ B (Yang y col., 2008; Lara-Zárate y col., 2011).

En forma concomitante, la señalización por TLR induce moléculas coestimuladoras esenciales para la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, como B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), las cuales son proteínas de superficie expresadas por CPA. La presencia de estas moléculas coestimuladoras y la presentación de los componentes antigénicos microbianos activan las células T CD4<sup>+</sup> requeridas para iniciar la respuesta inmune adaptativa (Takeda y Akira, 2005).

### 1.2.1.2.2 Citoquinas

Las citoquinas son un grupo heterogéneo de glucoproteínas de bajo peso molecular (menos de 50 kDa) secretadas por células inmunes y no inmunes, actúan como señales de comunicación intercelular en la hematopoyesis, el estrés, la inflamación, la inmunidad y la reparación tisular (Rouveix, 1997; Wood y Rothel, 1997; Belardelli y Ferrantini, 2002). Uno de los principales mecanismos por el que ejercen sus efectos es a través de la activación de la transducción de señales intracelulares y de la consecuente regulación génica (Gouwy y col., 2005; Bannerman, 2009).

En la GM, las citoquinas regulan la intensidad y la duración de la respuesta inmune del animal a IIM mediante la estimulación o inhibición de la proliferación y diferenciación de células involucradas en dicha respuesta. Además pueden indirectamente influir en la severidad y duración de la mastitis mediante la regulación de la respuesta migratoria de los leucocitos y la eficiencia de la fagocitosis en los sitios de infección (Bannerman, 2009; Wellnitz y Bruckmaier, 2012).

Diferentes poblaciones de células en GM secretan citoquinas, por ejemplo las CEM y los macrófagos, están entre las primeras células en activarse por toxinas bacterianas y otros factores asociados con colonización bacteriana, y en secretar una variedad de citoquinas. Ciertas citoquinas derivadas de macrófagos incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, regulan la magnitud y duración de la infiltración leucocitaria en los tejidos infectados. Si los neutrófilos son capaces de migrar rápidamente de la sangre a la GM y efectivamente eliminar la bacteria, el reclutamiento de leucocitos disminuirá y el recuento de células somáticas (RCS) en la leche retornará a los niveles pre-infección. Una respuesta inflamatoria eficiente de la GM generalmente debe durar menos de una semana y no causar ningún cambio notable en la leche o tejidos mamarios (Sordillo, 2018). Sin embargo, si la bacteria persiste, la respuesta inflamatoria puede tornarse exagerada desencadenando un cuadro agudo o crónico no controlado. Una prolongada o excesiva migración de

leucocitos desde la sangre causa considerable daño al parénquima mamario, resultando en disminución de la producción láctea (Nickerson y Sordillo, 2017). Por lo tanto, las respuestas inflamatorias de la GM deben tener un inicio rápido para neutralizar las bacterias durante las etapas iniciales de invasión tisular, pero una resolución oportuna para evitar la inmunopatología (Sordillo, 2018).

### 1.3 INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA

Al finalizar la lactancia, la involución normal de la GM bovina, que comúnmente se denomina etapa de “vaca seca”, es de fundamental importancia para asegurar una máxima producción de leche durante la lactancia siguiente (Sorensen y Enevoldsen, 1991). En relación a la duración de este periodo se han realizado numerosos estudios, demostrando que un periodo de secado de 40 a 60 días de duración promueve la proliferación de las células epiteliales mamarias para maximizar la producción y la calidad composicional de la leche (Capuco y col., 1997; Kuhn y col., 2005; Sawa y col., 2012; Cermakova y col., 2014).

La involución es un proceso mediante el cual el tejido glandular mamario se somete a una amplia remodelación que implica la muerte celular coordinada, degradación de la matriz extracelular y la regeneración del tejido adiposo (Campbell y col., 2014). La fisiología de la GM en este periodo difiere marcadamente respecto de la presentada durante la lactancia y consta de 3 fases o etapas progresivas diferentes: 1) la **fase de involución activa**, 2) la **fase de involución estable** y 3) la **fase de lactogénesis y calostrogénesis** (Smith y Todhunter, 1982) (Figura 4).

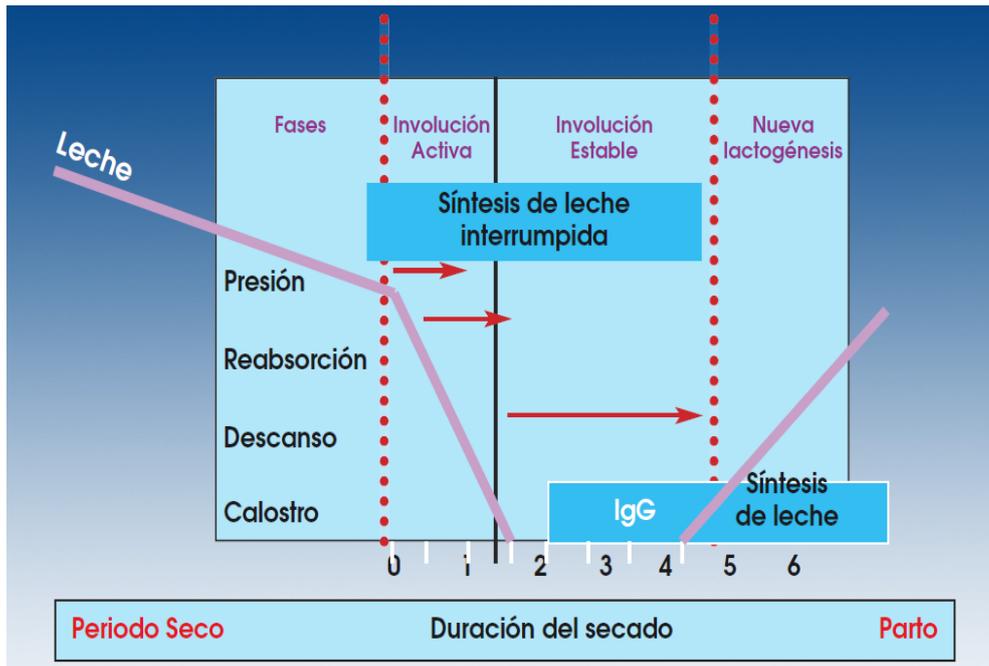


FIGURA 4. Fases de la involución de la GM.

La fase de **involución activa** comienza con el cese de la lactancia y dura aproximadamente entre 21 y 28 días (Sordillo y Nickerson, 1988). Si bien este periodo de transición funcional de estado lactante a no lactante es necesario para maximizar la subsecuente producción de leche, la GM muestra una susceptibilidad aumentada a adquirir nuevas IIM en esta fase (Oliver y Sordillo, 1988; Kutilla y col., 2003). Durante este periodo la GM sigue produciendo leche, lo cual induce un incremento en la presión intramamaria. Al mismo tiempo, el cese del ordeño determina que no se elimine regularmente el contenido de la glándula y se interrumpa el proceso de arrastre que ejerce la salida de la leche para su desinfección (Smith y Todhunter, 1982). Estos hechos se ven acompañados además por otros cambios tanto a nivel anatómico como fisiológico:

- Cambios anatómicos en el pezón: ensanchamiento y acortamiento debido al aumento de la presión intramamaria, lo que facilita la entrada de bacterias, puesto que el tapón de queratina está recién comenzando a constituirse.

- Progresiva pérdida de actividad de las células alveolares secretoras, con la consecuente reducción de la secreción láctea.
- Apoptosis y autofagia de las células secretoras (Zarzynska y Motyl, 2008).

Paralelamente, se producen cambios en la composición de la secreción láctea:

- Incremento en la concentración de neutrófilos y macrófagos, encargados de la remoción de células epiteliales dañadas, restos de leche, grasa y caseína; lo cual compromete la capacidad fagocítica de estas células para hacer frente a los microorganismos patógenos.
- Elevadas concentraciones de citrato.
- Aumento progresivo del nivel de Lf.
- Disminución de la síntesis de grasa, lactosa y caseína.
- La Lf constituye uno de los mecanismos de defensa inespecíficos en la GM en involución, relacionadas con su alta afinidad de unión al hierro. Este elemento constituye un nutriente necesario para el crecimiento de numerosas bacterias patógenas, las cuales, de invadir la GM, deberán competir con la Lf por su disponibilidad (Rodríguez-Franco y col., 2005). En esta etapa, los niveles de Lf se hallan disminuidos, motivo que favorece el desarrollo bacteriano debido a su libre disponibilidad de hierro (Kutila y col., 2003).

Seguidamente se inicia la **involución estable**. Durante este periodo se sella el canal del pezón con un tapón de queratina, el volumen de la secreción mamaria es mantenido a niveles de sólo unos pocos mililitros, mientras que sus principales constituyentes se reducen a mínimas concentraciones (lactosa y citrato se encuentran a concentraciones menores a 5 mg/ml y 0,2 mg/ml respectivamente).

La última fase es la de **calostrogénesis**, comienza dos semanas antes del parto y es el periodo en el cual la glándula se prepara para producir y

almacenar calostro. Se produce aumento del volumen de la GM, las células alveolares se incrementan en número y en actividad, y el flujo sanguíneo aumenta considerablemente, lo cual puede provocar edemas mamarios. Se modifica la relación molar citrato/Lf, incrementándose alrededor de 100 veces en los días próximos al parto, lo cual se traduce en una pérdida de las propiedades antimicrobianas de la Lf (Kutilla y col., 2003). Los macrófagos predominan sobre otros tipos celulares, aunque su capacidad fagocítica, al igual que la de los neutrófilos se ve disminuida. Se eleva la concentración de grasa, lactosa y caseína, favoreciendo el desarrollo bacteriano. El conducto del pezón también se dilata y acorta debido a la mayor presión intramamaria, facilitando así el acceso de patógenos al interior de la glándula. Por lo tanto, también en este periodo existe una susceptibilidad aumentada para adquirir nuevas IIM causadas por bacterias patógenas ambientales (Smith y Hogan, 1982; Oliver y Mitchell, 1983; Dingwell y col., 2003b; Schukken y col., 2011).

Las IIM que se originan en el periodo de involución pueden reducir la producción láctea hasta en un 35% (Sordillo y Nickerson, 1988; Sordillo y col., 1989) y comúnmente se asocian con mastitis clínicas durante el primer mes de lactancia (Oliver y Mitchell, 1983; Pantoja y col., 2009). El origen de estas IIM puede ser debido a bacterias que ingresan por el canal del pezón durante este periodo o bien bacterias remanentes que ingresaron durante la lactancia (Green y col., 2007). La probabilidad de nuevas IIM durante el secado depende del tipo de exposición a los microorganismos, la eficiencia de los mecanismos de defensa de la GM y la correcta terapia antibiótica durante este periodo (Green y col., 2007; Leelahapongsathon y col., 2016). Aproximadamente del 10% al 17% de los cuartos mamarios desarrollan nuevas IIM durante el periodo de secado, y la mayoría de estas infecciones son causadas por microorganismos ambientales (Pantoja y col., 2009).

Durante la involución de la GM numerosos leucocitos, incluidos neutrófilos, macrófagos y linfocitos, se infiltran en las secreciones mamarias dentro del lumen de alvéolos y conductos (Lee y col., 1969, 1983; Lee y Outteridge, 1981). Durante la involución se producen dos oleadas de migración

de células fagocíticas hacia la GM, la primera que involucra el reclutamiento de neutrófilos durante los primeros 2 días después del secado, y la segunda a los 4 días que involucra a los macrófagos. Estas células serán las predominantes en las secreciones mamarias hasta la involución completa (Lee y col., 1980; Miller y col., 1991; Sarikaya y col., 2004, 2005; Merle y col., 2007, Koess y Hamann, 2008, Della Libera y col., 2015).

### **1.3.1 Terapia en el periodo de secado**

La terapia de la vaca seca tradicionalmente se refiere al uso de la terapia antibiótica intramamaria (IM) inmediatamente después del último ordeño de la lactancia. Los productos aprobados aplicados por infusión IM en el proceso de secado pueden disminuir el número de IIM existentes, prevenir nuevas infecciones durante las primeras semanas del periodo de secado y reducir la incidencia de las mastitis clínicas al iniciar la siguiente lactancia (Bradley y Green, 2004; Shephard y col., 2004; Pieper y col., 2013).

El tratamiento de secado a todo el rodeo reduce significativamente la incidencia de IIM durante este periodo en animales libres de IIM al momento de la interrupción de la lactancia (Robert y col., 2006). Esto se debe a la persistencia de las preparaciones antibióticas de liberación lenta durante las etapas iniciales y medias del periodo de secado y probablemente a un sellado más rápido del canal del pezón en los animales tratados (Robert y col., 2006; Green y col., 2008). Como limitante a la eficacia de esta práctica, se debe considerar que las formulaciones para vacas seca se muestran más activas durante las primeras semanas del periodo de secado y probablemente brinden poca o ninguna protección contra las IIM que se producen durante el periparto, periodo en el cual la vaca está más expuesta a contaminación con estreptococos ambientales (Oliver y col., 1990).

El tratamiento de las IIM subclínicas al secado con antibióticos en base de liberación lenta acorta la duración de las infecciones existentes (reduciendo su prevalencia) pero además disminuye efectivamente la incidencia de IIM

durante el periodo de secado. Esto lleva a una menor prevalencia de IIM al parto y de mastitis clínicas durante la lactancia subsiguiente (Halasa y col., 2009). La terapia de vaca seca reduce en un 70% el nivel de infección en el periodo que va del secado al parto, siendo más eficaz que el tratamiento durante la lactancia y permitiendo una mejor regeneración del tejido dañado (Eberhart, 1986; Robert y col., 2006).

Una alternativa al tratamiento de todo el rodeo con antibióticos es limitar su uso a aquellas vacas con IIM al secado (terapia selectiva) o bien reemplazar los antibióticos con selladores internos de pezones (Krömker y Leimbach, 2017). Esta última alternativa solo será efectiva para reducir nuevas infecciones durante el periodo seco, ya que no se eliminarán las infecciones presentes antes del secado (Huxley y col., 2002). Trabajos publicados han mostrado que el efecto profiláctico de los selladores internos durante el periodo de secado es semejante al obtenido con el uso de antibióticos (Sanford y col., 2006; Rabiee y Lean, 2013). Algunos autores han utilizado selladores internos en forma combinada con antibióticos para vaca seca a los efectos de mantener la capacidad del antibiótico de eliminar IIM y obtener el efecto preventivo del sellador durante el parto (Whitfield y Laven, 2018).

Es probable que el uso de la terapia selectiva de vaca seca en animales con evidencia de IIM subclínica sea crucial si se quieren cumplir los objetivos de reducir el uso de antimicrobianos (Edmondson, 2016; Krömker y Leimbach, 2017). En los últimos años, la necesidad de lograr mayores tasas de curación de IIM en el secado temprano y prevenir nuevas IIM, ha motivado la búsqueda de nuevas alternativas de control dirigidas a reforzar tanto la terapia antimicrobiana administrada al secado, como los factores protectores naturales de la GM.

## 1.4 MASTITIS BOVINA

### 1.4.1 Generalidades

La mastitis bovina es la inflamación de la GM en respuesta a una agresión local al tejido mamario que puede ser de origen infeccioso, mecánico o tóxico. Sin embargo, la gran mayoría de los casos de mastitis son debidos a IIM causadas por microorganismos, principalmente bacterias, que invaden la GM, se desarrollan y generan productos tóxicos perjudiciales para el tejido mamario. Se han identificado más de 80 agentes causales de mastitis, incluyendo especies de bacterias, hongos, micoplasmas y algas (Bogni y col., 2011; Gomes y Henriques, 2016). Las IIM están acompañadas por una gran afluencia de leucocitos polimorfonucleares a la GM infectada con la secreción de mediadores inflamatorios en la leche. Durante la inflamación, el sistema inmune se activa para proteger al hospedador y eliminar al patógeno (Sordillo, 2018).

Dependiendo de la presencia de signos evidentes de enfermedad, la mastitis bovina puede clasificarse en clínica y subclínica (Castro y col., 2006; Gomes y Henriques, 2016). La mastitis clínica se reconoce por su aparición repentina y por los cambios macroscópicos en la GM y/o en leche (Gasque Gómez, 2008) mientras que la mastitis subclínica no provoca inflamación glandular visible, ni cambios organolépticos en leche (Castro y col., 2006).

La ocurrencia y la intensidad de un caso de mastitis dependen de numerosos factores que están asociados al animal infectado, a la bacteria patógena y al medio ambiente en que ambos se encuentren. Esta característica multifactorial convierte a la mastitis en un problema complejo que requiere un abordaje multidisciplinario (Ruegg, 2017).

### 1.4.2 Principales causantes de mastitis

Cientos de microorganismos diferentes pueden causar mastitis y éstos pueden proliferar en el animal o en su entorno (Philpot y Nickerson, 2000;

Bradley, 2002). En particular, las bacterias causantes de mastitis han sido clasificadas dependiendo de su hábitat principal y de su forma de transmisión, en patógenos ambientales y contagiosos (Gomes y Henriques, 2016).

Los *patógenos ambientales* se encuentran en el ambiente donde vive el animal; pasturas, cama, excremento, entre otros, (Smith y Hogan, 1993) y pasan a la GM en los periodos entre ordeño. Al no estar adaptados a la GM, algunos de estos patógenos producen respuestas inflamatorias importantes que se traducen en casos de mastitis clínicas que suelen durar poco tiempo. Se incluye un grupo heterogéneo donde se encuentran bacterias Gram positivas como *Streptococcus dysgalactiae* (Smith y Hogan, 1997), *Streptococcus uberis* y los estafilococcus coagulasa negativos (SCN) y por otra parte, bacterias Gram negativas representadas principalmente por coliformes (Oliver y Sordillo, 1988). El reservorio primario de estos patógenos es el ambiente, y la exposición de los cuartos no infectados a los patógenos ambientales puede ocurrir en cualquier momento durante la vida del animal (Zadoks, 2002). La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a los rodeos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos basado en higiene y terapia antibiótica (Calvinho y col., 1998; Rysanek y col., 2009).

Los *patógenos contagiosos* viven y se multiplican sobre y dentro de la GM infectada, además se propagan entre cuartos de un mismo animal o de un animal a otro, principalmente durante procedimientos de ordeño poco higiénicos. Este grupo incluye: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae*, especies de *Mycoplasma* spp. y *Corynebacterium* spp. (Djabri y col., 2002; Tenhagen y col., 2006; Smulski y col., 2011).

Esta clasificación clásica de patógenos contagiosos y ambientales es de uso muy difundido, aunque evidencia reciente sugiere que numerosos patógenos ambientales son más capaces de adaptarse a la GM de lo que se creía, esta adaptación podría basarse en la capacidad de los patógenos de secuestrar hierro, sobrevivir dentro de fagocitos y CEM (Jamali y col., 2018).

Los patógenos también pueden clasificarse en mayores y menores dependiendo del tipo de mastitis que provoquen, dentro de los patógenos mayores se encuentran aquellos que causan mastitis clínicas: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *M. bovis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. Los patógenos menores son aquellos que normalmente causan mastitis subclínica y en ocasiones mastitis clínica, en este grupo se encuentran a los SCN que se aíslan comúnmente de muestras de leche y del canal del pezón (Bogni y col., 2011). La prevalencia de la mastitis bovina por SCN es alta durante la primera lactación de las vacas pero es aún más común después del parto. *Corynebacterium bovis* causa una mastitis clínica leve y este microorganismo se disemina rápidamente de vaca en vaca cuando no se aplica un sellado correcto, pero manteniendo una higiene y manejo adecuado, la presentación de esta bacteria es mínima (Romero, 2014).

Las medidas de control tales como mejorar la higiene durante el ordeño ha reducido la prevalencia de patógenos mayores contagiosos como *S. agalactiae* (Makovec y Ruegg, 2003; Pitkala y col., 2004). Sin embargo, otras bacterias como estreptococos ambientales han adquirido importancia y la reducción de mastitis subclínicas no ha acompañado a la reducción de mastitis clínicas (Myllys y col., 1998; Tenhagen y col., 2006).

#### **1.4.2.1 Mastitis causada por *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina (Calvinho y Tirante, 2005), como en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi y col., 2006a; Tenhagen y col., 2006; Wickstrom y col., 2009; Keane y col., 2013; Peton y Le Loir, 2014). Aunque es caracterizado como un patógeno contagioso que se distribuye predominantemente durante el proceso de ordeño, también se ha aislado de terneras y vacas primíparas antes y después del parto (Roberson y col., 1998; Edinger y col., 2000). Las infecciones por esta bacteria se asocian con mastitis clínicas y subclínicas, ambas frecuentemente resultan en infecciones persistentes

y recurrentes con una baja tasa de curación después de la terapia con antibióticos (Schukken y col., 2011).

Clásicamente, se lo ha caracterizado como un patógeno extracelular (Finlay y Cossart, 1997), sin embargo, un número creciente de estudios ha demostrado la habilidad de *S. aureus* de invadir y sobrevivir dentro de diferentes tipos celulares del hospedador, incluyendo células epiteliales, neutrófilos y macrófagos (Almeida y col., 1996; Hebert y col., 2000; Sinha y Fraunholz, 2010) protegiéndose así de la respuesta inmune humoral del hospedador y del tratamiento con antibióticos (Hebert y col., 2000). Además, las infecciones persistentes o difíciles de tratar pueden relacionarse con la capacidad de este patógeno para formar una población de crecimiento lento denominada variantes de colonias pequeñas (SCV: *Small Colony Variants*) que pueden sobrevivir dentro de las células fagocíticas profesionales y no profesionales y posteriormente modular las respuestas inmunitarias (Sinha y Herrmann, 2005; Atalla y col., 2008; Tuchscher y col., 2015).

En la infección de la GM, *S. aureus* puede localizarse en forma de conglomerados dentro de los alvéolos y conductos lácteos y en asociación con el tejido epitelial (Melchior y col., 2006). Estos conglomerados corresponden a un crecimiento bacteriano en forma de colonias adherentes rodeadas por una matriz compuesta por exopolisacáridos, proteínas, ADN extracelular, y otras sustancias que se encuentran distribuidas entre las células bajo un patrón no homogéneo, cuya estructura completa constituye el *biofilm* o biopelícula (Flemming y Wingender, 2010). Este modo de crecimiento produce alteraciones con respecto a la expresión génica y la producción de proteínas (Donlan y Costerton, 2002; Parsek y Singh, 2003; Archer y col., 2011; Kiedrowski y Horswill, 2011).

Se ha documentado que la formación de *biofilm* es un importante factor de virulencia de *S. aureus* que facilita la adherencia y colonización del epitelio de la GM y que constituye un medio por el cual las bacterias evaden las defensas inmunológicas del animal causando IIM persistentes en los bovinos (Cucarella y col., 2002; 2004; Melchior y col., 2006). La formación de *biofilm* perjudica la

acción tanto del sistema inmune del hospedador, como de los agentes antimicrobianos, y por lo tanto representa uno de los mecanismos de supervivencia más importantes de bacterias que colonizan en forma persistente el nicho extracelular (Melchior y col., 2006). Esta conformación de biopelícula permite que cepas de *S. aureus* se adhieran y colonicen eficazmente el epitelio de la GM. No obstante, esta estructura libera células planctónicas de las capas externas permitiendo infecciones persistentes, las que generan los mayores problemas a la hora de intentar erradicar este tipo de infecciones (Melchior, 2006). Estudios realizados *in vitro* con líneas celulares epiteliales mamarias demostraron que existe una interacción específica entre las bacterias recubiertas por esta capa mucoide y las células epiteliales, la cual sería un paso fundamental en la colonización de la glándula (Pahissa, 2009).

Por otra parte, la formación de *biofilm* contribuye a que *S. aureus* pueda resistir a la terapia antibiótica (Cucarella y col., 2004; Fey y Olson, 2010). Estudios *in vitro* han demostrado que el crecimiento bacteriano en *biofilm* puede transformar 10-1000 veces más resistentes a las bacterias a los efectos de los antimicrobianos cuando se comparan con bacterias de la misma cepa crecidas en forma planctónica (Conley y col., 2003). La resistencia antimicrobiana es a menudo transferida horizontalmente entre bacterias relacionadas y esto ocurre con notable facilidad dentro de un *biofilm* (Melchior y col., 2006). El locus *blaZ* que codifica la resistencia a penicilina (Sidhu y col., 2001), así como la formación de *biofilm*, está asociado con fallas de la terapia antibiótica y conduce a un mayor riesgo de presentación de IIM persistentes (Haveri y col., 2007). En los últimos años, se agregó un nuevo agravante al problema de la resistencia, con la aparición de reportes de casos de mastitis bovina producidos por *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Moon y col., 2007; Turutoglu y col., 2009; van Duijkeren y col., 2014; Paterson y col., 2014). Sumado a que la presencia de los genes *mecA* y *mecC* en aislamientos MRSA provenientes de bovinos con mastitis puede representar un riesgo de potencial zoonótico para los humanos, ya que estudios utilizando epidemiología tradicional y secuenciación genómica han identificado posible transmisión entre bovinos y humanos

(Petersen y col., 2013; Harrison y col., 2013). Sin embargo, cabe destacar que si bien la detección de MRSA es un evento frecuente en aislamientos de *S. aureus* de seres humanos en Argentina (Bermejo y col., 2012), hasta el momento no se ha informado la detección de MRSA en aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina en nuestro país.

#### **1.4.2.1.1 Internalización de *Staphylococcus aureus* a las células eucariotas**

La capacidad de *S. aureus* de invadir y sobrevivir dentro de las células epiteliales, le confiere protección contra el sistema inmune del hospedador y el tratamiento con antibióticos, por lo que se considera como uno de los factores más importantes que contribuyen a la persistencia de este patógeno en la GM (Almeida y Oliver, 2001; Buzzola y col., 2007; Oviedo-Boyso y col., 2008). Esta dinámica de internalizar y persistir dentro de la célula, conduce a que *S. aureus* provoque IIM crónicas características de esta especie (Kerro Dego y Van Dijk, 2002).

Existe evidencia de que varias cepas de *S. aureus* tienen la habilidad de invadir y persistir dentro de células fagocíticas no profesionales, tales como las epiteliales (Almeida y col., 1996; Wang y col., 2013), endoteliales (Peacock y col., 1999; Sinha y Herrmann, 2005), osteoblastos (Ellington y col., 1999; Trouillet y col., 2011), fibroblastos (Usui y col., 1992; Hagggar y col., 2003) y células renales (Murai y col., 1992; Sinha y col., 1999). Las bacterias inicialmente se adhieren a la membrana celular y a los sustratos de la matriz extracelular a través de las proteínas de superficie (adhesinas) (Foster y Hook 1998). Este paso en la adherencia e invasión de células eucariotas es el más importante en la patogénesis bacteriana (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006). Las bacterias se adhieren a diferentes componentes de la matriz extracelular (colágeno, vitronectina, fibrinógeno y especialmente Fn (fibronectina)) a través de interacciones proteína-proteína mediadas por una variedad de proteínas de superficie denominadas MSCRAMMs (MSCRAMMs: *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Además, las adhesinas

bacterianas reconocen elementos de la superficie de la célula hospedadora, tales como integrinas, cadherinas y selectinas (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006). La adhesión de patógenos se produce de dos maneras: las adhesinas se acoplan directamente al receptor de la superficie de la célula huésped, como *Listeria* spp. (Pizarro- Cerdá y col., 2012), *Yersinia* spp. (Isberg y Leong, 1990; Nagele y col., 2011), y *Neisseria gonorrhoeae* (Nagele y col., 2011; Van Putten y col., 1998), o bien las conexiones bacterianas se forman indirectamente con el receptor del huésped a través del reclutamiento de proteínas de matriz extracelular como en el caso de *S. aureus* (Sinha y col., 1999; Hoffman y col., 2011; Alva- Murillo y col., 2014a).

En células fagocíticas no profesionales como las células epiteliales el receptor de integrina  $\alpha 5\beta 1$ , los chaperones, y el receptor scavenger CD36 son los principales receptores involucrados durante la internalización de *S. aureus* (Alva- Murillo y col., 2014b).

Una vez que *S. aureus* ingresa al citoplasma, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B estaría vinculado con la señalización intracelular (Oviedo-Boyso y col., 2008). NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción importante y crítico en la regulación de muchos procesos celulares (Oviedo-Boyso y col., 2008; Hart y col., 1998; Perkins 2007) y la internalización de *S. aureus* en las células epiteliales puede reducirse al inhibir la activación de NF- $\kappa$ B (Wei y col., 2018).

### **1.4.3 Tratamiento de la enfermedad**

En Argentina, los programas actuales de control de mastitis bovina fueron desarrollados en la década del 60 (Booth, 1975; Calvino, 2007) e incluyen por un lado, pautas adecuadas de manejo de los animales e higiene durante el ordeño y por el otro, la administración de antibióticos y/o fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como así también el descarte de la leche obtenida de los cuartos infectados, la eliminación de la GM infectada o incluso el sacrificio del animal.

La mastitis es una de las principales causas del uso de antibióticos en vacas lecheras (Mitchell y col., 1998; DANMAP, 2003; Tenhagen y col., 2006). Sin embargo, este tratamiento no es completamente efectivo contra los patógenos ambientales (Leitner y col., 2013) y sobre las bacterias capaces de residir intracelularmente dentro de la GM y de formar abscesos, las cuales son las más difíciles de combatir debido a la restricción de su contacto con el antimicrobiano (Zhao y Lacasse, 2008). En el caso de *S. aureus*, el tratamiento de mastitis clínica en vacas que están infectadas crónicamente, las tasas de curación son generalmente menores al 35% y en la mayoría de los casos, cuando los síntomas clínicos desaparecen, la infección se ha pasado simplemente a un estado subclínico (Ruegg, 2010). Bannerman y Wall (2005) concluyeron que las terapias disponibles para el tratamiento de la mastitis causada por *S. aureus* permanecen subóptimas y por lo tanto ineficaces. Por otra parte, la formación de biofilm se ha visto como uno de los principales factores que contribuyen a la resistencia a los antibióticos y a la presencia de mastitis recurrentes (Gomes y Henriques, 2016; Gomes y col., 2016).

La resistencia a agentes antimicrobianos tiene dos aspectos relevantes, el primero es una reducción en las tasas de curación después del tratamiento de los casos clínicos (Owens y col., 1997; Sol y col., 2000) y el segundo es el impacto potencial de la transmisión de antibióticos a través de la cadena alimentaria provocando resistencia en humanos (Capita y Calleja, 2013; Bull World Health Organ, 2015; Papadopoulos y col., 2018). Además, el uso de antibióticos tiene otras desventajas sobre la salud pública, la presencia de ellos en la leche puede provocar reacciones alérgicas en individuos hipersensibles (Dewdney y col., 1991; Dayan, 1993), e inducir alteración de la flora intestinal, desarrollo de microorganismos patógenos y reducción de la síntesis de vitaminas (Adaska y col., 2006; Khachatryan y col., 2006).

Estudios realizados durante el periodo no lactante de los animales determinaron que la glándula completamente involucionada es marcadamente resistente a las IIM (Oliver y Sordillo, 1988; Nickerson, 1989). Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que acelerando el proceso de

involución mamaria e incrementando los factores defensivos naturales es posible favorecer la prevención de nuevas infecciones (Oliver y Smith, 1982). Dentro de las posibles alternativas para aumentar la resistencia a las infecciones, se ha contemplado la estimulación de la respuesta inmune de la GM por medio del uso de inmunomoduladores o moduladores de la respuesta inmune (MRI). Estos agentes se han utilizado individualmente para potenciar regímenes de terapia antibiótica o de inmunización específica (vacunas), y pueden convertirse en una alternativa eficaz a los métodos tradicionales de control de las mastitis (Tzianabos, 2000; Bradley, 2002; Trevisi y col., 2014 Sankar, 2016).

#### **1.4.4 Importancia económica**

Las IIM por *S. aureus* provocan un importante impacto en la producción y calidad de la leche, convirtiendo a la mastitis bovina en la enfermedad más costosa del ganado lechero (Zecconi y col., 2006a; Halasa y col., 2007; Roussel y col., 2015).

El daño económico está relacionado con pérdidas directas e indirectas. Las pérdidas directas incluyen el costo por tratamiento, el descarte de leche, servicio veterinario y labor del empleado, muertes de los animales y costo asociado con casos de repetición de mastitis. Las indirectas incluye la disminución en la producción y calidad de la leche, pérdidas de premios económicos, secado de vacas anticipadamente, bajas condiciones de bienestar animal, y predisposición a otras enfermedades (Petrovski y col., 2006; Halasa y col., 2007). Además, provoca problemas relacionados con la salud pública, a causa del riesgo de la presencia de residuos en leche por el inadecuado uso de antimicrobianos para el tratamiento de casos clínicos y a la potencial emergencia de bacterias resistentes (De Vliegher y col., 2012).

En Estados Unidos los principales costos han sido atribuidos al tratamiento de los casos de mastitis clínicas causados por bacterias Gram-positivas, Gram-negativas u otros organismos tales como *Mycoplasma* spp y han

sido estimados en US\$ 133,73, US\$ 211,03, y US\$ 95,31 respectivamente (Cha y col., 2011).

En Argentina no se dispone de estadísticas actualizadas acerca de las pérdidas económicas causadas por la mastitis y los datos disponibles son parciales ya que no incluyen a las principales cuencas lecheras del país. Vissio y col. (2015), estimaron los costos diarios directos de la mastitis y las erogaciones derivadas de su control y prevención en la cuenca de Villa María, Córdoba. El costo total diario, representado por la sumatoria de las pérdidas productivas por mastitis subclínica, elevado RCS, mastitis clínica y gastos de control, expresado por cada vaca en ordeño fue de US\$ 1,0/vaca/día.

## **1.5 MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE**

### **1.5.1 Moduladores de la respuesta inmune (MRI)**

El término inmunoterapia se aplica a cualquier tratamiento dirigido a “modular” el sistema inmune de un organismo para tratar o prevenir una enfermedad (Steinman y Mellman, 2004).

La capacidad inmunológica de las células inflamatorias puede ser activada por compuestos MRI o inmunomoduladores (Zecconi y col., 1999; Takahashi y col., 2005; Dallard y col., 2010; De y Mukherjee, 2013). Estos compuestos son capaces de interactuar con el sistema inmune regulando la respuesta del hospedador (Tzianabos, 2000).

La inmunomodulación implica la regulación, supresión o intensificación de la respuesta inmune (Hu, 2001). En función al estado que se desea evaluar, el efecto inmunomodulatorio se puede lograr a través del uso de sustancias de origen biológico o químico para producir una respuesta inmune adecuada. Así, en algunos casos, se buscará intensificar la respuesta (estrés, vacunación, infecciones) mientras que en otros, se tratará de reducirla (enfermedades autoinmunes, trasplantes, alergias, hipersensibilidad).

Con respecto a los MRI intensificadores se pueden dividir ampliamente en dos grupos diferentes: inmunoestimulantes (saponinas, agonistas de receptores Toll, citoquinas) y agentes “delivery” (emulsiones, micropartículas, sales minerales) (Cox y Coulter 1997; O’Hagan, 2015). Los inmunoestimulantes estimulan las CPA y promueven la secreción de varias citoquinas, mientras que los agentes “delivery” ayudan a preservar la conformación de los antígenos (Ag) para una presentación adecuada a las CPA y de esa manera proporcionar una estimulación inmune lenta y continuada (Burakova y col., 2017).

Numerosos inmunomoduladores se basan en el uso de agentes microbianos, o sus productos (Zecconi y col., 1999; Inchaisri y col., 2000; Dallard y col., 2008, 2010). El tipo de actividad de estos compuestos depende de su mecanismo de acción, sitio de acción, dosis y tiempo de administración (Tzianabos, 2000). Por lo tanto el uso de inmunoestimulantes en bovinos puede convertirse en una alternativa eficaz a los métodos tradicionales de control de las IIM (Campos y col., 1993).

### **1.5.2 Mecanismo de acción de los moduladores de la respuesta inmune**

Los últimos avances en inmunología han permitido identificar mecanismos celulares y moleculares, que participan directa o indirectamente en la respuesta inmune normal y en estados de enfermedad. Debido a esto, son diversos los blancos potenciales a los que van dirigidos los MRI, estos incluyen moléculas específicas de activación presentes sobre diferentes células del sistema inmune, primordialmente en la superficie de linfocitos T y B; mediadores inflamatorios solubles tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, enzimas e inmunoglobulinas, así como los receptores de superficie para dichos mediadores inmunológicos (Lee y col., 2010). Las alteraciones que producen se basan en cambios en la expresión genética, en el transporte intracelular de proteínas, o en la secreción y expresión de proteínas en la superficie celular, lo cual induce cambios celulares que pueden influir en

el inicio, consecución y regulación de la respuesta inmune (Quinn, 1990; Pell, 1995).

En seres humanos y animales, los inmunomoduladores pueden actuar de forma específica o inespecífica:

#### **1.5.2.1 Inmunomoduladores de acción inespecífica**

Son agentes que logran una estimulación o supresión de la respuesta inmune sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado. Se diferencian en tres tipos según su acción (Stites y col., 1985; Takx-Köhlen, 1992), los que actúan sobre el sistema inmune normal (Tipo I); los que actúan sobre el sistema inmune inmunodeprimido (Tipo II); los que actúan sobre el sistema inmune funcionalmente normal o inmunodeprimido (Tipo III).

#### **1.5.2.2 Inmunomoduladores de acción específica**

Logran su acción sobre células del sistema inmune, por la presencia de un antígeno o inmunógeno dado, por lo que hay especificidad selectiva en la acción de estas células para producir una respuesta inmune. La inmunomodulación es selectiva cuando hay estimulación y su resultado significa una inmunorreacción hacia un antígeno o varios, como es el caso de los adyuvantes inmunológicos o las vacunas terapéuticas (Stites y col., 1985; Takx-Köhlen, 1992; Gupta y col., 1995).

#### **1.5.3 Características de los moduladores de la respuesta inmune**

Un inmunomodulador ideal, según Quinn (1990), debe poseer las siguientes características:

- No debe ser tóxico, ni pirogénico, aún en dosis elevadas, ni poseer actividad mutagénica, carcinogénica o tener algún efecto adverso a largo plazo.
- Debe tener características de adyuvante e incrementar la respuesta inmune (para su uso en vacunas).
- Debe estimular los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa frente a patógenos.
- Debe ser inactivo o biodegradado en el medio ambiente.
- Debe ser activo por vía oral y mantener su estabilidad en agua y alimentos.
- Debe ser compatible con otros fármacos, incluidos antibióticos y antiparasitarios.

#### **1.5.4 Inmunomoduladores en glándula mamaria bovina**

Existen numerosos estudios basados en la aplicación de MRI para potenciar los mecanismos de la respuesta inmune contra patógenos causantes de mastitis bovina e incrementar así la resistencia frente a IIM (Takahashi y col., 2004; Ahn y col., 2006a; 2006b; Baravalle y col., 2010; Dallard y col., 2010; Fu y col., 2013; Leitner y col., 2013; Trevisi y col., 2014; Nayeli y col., 2014; Díaz-Murillo, 2016). Por lo que, el uso de MRI podría convertirse en una alternativa eficaz a los métodos tradicionales de control de las IIM al momento de la involución (Zecconi y col., 1999).

Numerosos compuestos han sido utilizados como potenciales MRI en la GM bovina. Entre ellos:

-Componentes del sistema inmune: inmunoglobulinas como IgY (Zhen y col., 2009), moléculas del complemento (Sordillo y Streicher, 2002), citoquinas (Alluwaimi, 2004) como IL-2 recombinante bovina (Wedlock y col., 2000), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Riollet y col., 2000a; Wedlock y col., 2000), factor estimulante de colonias de granulocitos (Boulanger y col., 2003).

-Virus: *Parapox ovis* (Zecconi y col., 1999).

-Componentes provenientes de hongos, insectos y crustáceos:  $\beta$  1,3-glucan (Inchaisri y col., 2000), quitosano (Se-Young y col., 2015; Lanctôt y col., 2017; Breser y col., 2018).

-Componentes bacterianos: LPS de *Escherichia coli* (Vandeputte-Van Messom y col., 1995; Dallard y col., 2008, 2009, 2010), muramil dipéptido (MDP) de *Nocardia sp.* (De y Mukherjee, 2013).

-Complejos vitamínicos (Wei y col., 2014a; Nayeli y col., 2014).

-Plantas medicinales o parte de sus componentes: *Azadirachta indica* (De y Mukherjee, 2009),  $\beta$ -defensinas de *Capsicum chinense* (Díaz- Murillo y col., 2016) e isoflavonas de *Radix puerariae* (Wu y col., 2016).

Los ensayos *in vitro* con MRI en células de la GM bovina son alentadores pero los estudios de eficacia *in vivo* continúan siendo críticos y necesarios para determinar la verdadera efectividad de los mismos cuando se los utiliza para la prevención o tratamiento de las IIM (Gomes y Henriques, 2016).

### 1.5.5 *Panax ginseng* como modulador de la respuesta inmune

*Panax ginseng* (PG) C.A. Meyer, cuyo nombre completo se debe a su descubridor Carl Anton von Meyer, se conoce normalmente por la medicina china como “Renshen”. Ren significa humano (por el parecido de la raíz con la figura humana) y Shen significa hierba en la antigua China (Gao, 2000). Esta especie ha sido utilizada medicinalmente por miles de años en Corea, China y Japón (Radad y col. 2006; Lee y col., 2012) y es utilizada ampliamente en preparaciones herbales occidentales como adaptógeno (Duke, 2000; Blumenthal, 2003; Lee y col., 2012). La producción global de la raíz se ha incrementado desde 3500 toneladas en 2004 a 6000 toneladas en 2010, lo que representa la segunda mayor venta de hierbas en los Estados Unidos y Europa (Jia y Zhao, 2009; Ding, 2010;) (Figura 5).



FIGURA 5. Planta de *Panax ginseng*.

#### 1.5.5.1 Propiedades de *Panax ginseng*

La raíz de PG contiene diversos componentes farmacológicos, incluyendo una serie de saponinas triterpenoides tetracíclicos, poliacetilenos, compuestos polifenólicos y polisacáridos ácidos (Kim y col., 2005; Kang y Min, 2012) que tienen diferentes efectos sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos, así como, sobre la función neuroendócrina, inmune, cardiovascular y del sistema nervioso central en seres humanos (Gillis, 1997; Attele y col., 1999). Las saponinas, también denominadas ginsenósidos, son consideradas su principal componente activo (Wang y col., 1979). Pueden ser hidrolizadas en dos partes: azúcares y sapogeninas (Chen y Zhang, 2001). Hasta el momento, se han identificado más de 40 ginsenósidos, siendo uno de los más abundantes el ginsenósido Rg1, el cual conforma el 0,37-0,5% del extracto de PG (Wang y col., 2005; Lee y col., 2012). Los ginsenósidos pueden ejercer una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales, entre otros (Song y Hu, 2009). Además, estudios recientes han revelado que el ginsenósido Rg1 extraído de la raíz de PG fue la saponina que generó mayor actividad adyuvante en ratones (Qu y col., 2011; Su y col., 2012; 2015).

#### 1.5.5.2 Mecanismo de acción de las saponinas

Las saponinas son compuestos anfipáticos conformados por uno o más restos de glucósidos hidrófilos unidos a un derivado triterpeno lipofílico

(Burakova y col., 2017). El mecanismo de acción de la función adyuvante de los dos tipos de saponinas existentes (saponinas esteroidales y saponinas triterpénicas) es desconocido, aunque podría estar relacionado con su capacidad para unirse al colesterol de las membranas celulares (Bomford y Court, 1989). Algunos autores postulan que las saponinas utilizan la vía de los receptores tipo *toll* para generar la inmunomodulación (Pannacci y col. 2006; Su y col., 2012; Zhao y col., 2014; Yuan y col., 2016), mientras que otros postulan que Nalp3 y otros componentes del inflamasoma estarían involucrados (Wilson y col., 2011; Morelli y col., 2012). De todos modos, el tipo de respuesta inmune que se genera después de la inmunización de una vacuna con adyuvante de saponina depende no sólo del propio adyuvante, sino también de factores tales como el antígeno, la vía de administración y el programa de inmunización (Song y Hu, 2009).

#### **1.5.5.3 Antecedentes de *Panax ginseng* como inmunomodulador**

Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado las habilidades inmunomodulatorias y efectos adyuvantes de PG en la GM bovina (Hu y col., 2001, 2003; Sun y col., 2007; 2009; Baravalle y col., 2010; 2011; 2015). En mayor parte, sus efectos inmunomodulatorios son debidos al efecto regulatorio en la producción de citoquinas y en la actividad fagocítica de macrófagos y células dendríticas, así como en la activación de linfocitos T y B (Ho y col., 2004; Tan y Vanitha, 2004).

En investigaciones realizadas por Hu y col. (1995) y Concha y col. (1996) se ha observado que el extracto de PG estimula significativamente la actividad fagocítica y oxidativa de los neutrófilos así como también de linfocitos de sangre periférica y leche bovina *in vitro*. Sin embargo, los efectos del PG *in vivo* no son claros. Avanzando en esta hipótesis, estudios *in vivo* realizados por Hu y col. (2001), mostraron que la inyección subcutánea de PG en vacas en lactancia con mastitis subclínicas por *S. aureus* incrementó significativamente la actividad fagocítica y oxidativa de los neutrófilos sanguíneos. Además, el número de

monocitos y linfocitos se incrementó en animales tratados con extractos de PG comparado con animales controles y disminuyó el crecimiento bacteriano y el RCS en leche en cuartos infectados con *S. aureus*. Estos hallazgos sugieren un incremento en la resistencia a la infección por *S. aureus* en GM luego del tratamiento con PG.

En relación al mecanismo de acción de PG, Pannacci y col. (2006) demostraron un incremento significativo en la producción de citoquinas proinflamatorias y en la expresión de ARN mensajero (ARNm) de TLR4 por parte de macrófagos provenientes de ratones sometidos a estrés que previamente fueron tratados por vía oral con PG. Por otro lado, Nakaya y col. (2004) demostraron que el tratamiento con extracto de raíz de PG estimula la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por parte de los esplenocitos y macrófagos peritoneales provenientes de ratones C3H/HeN, no así en ratones C3H/HeJ deficientes en el gen que codifica para TLR4.

En relación al reconocimiento de PG o sus componentes por parte de los receptores *toll* existe escasa información disponible. En este sentido Su y col. (2015), colocalizaron mediante microscopía confocal al LPS junto a TLR4 en macrófagos murinos (RAW 264.7) pretatados con distintas concentraciones de Rg1 y Re, principales ginsenósidos de la raíz de PG, y estimulados con LPS. Los resultados mostraron que la intensidad de marcación del LPS disminuyó cuando las concentraciones de Rg1 y Re se incrementaron, indicando que Rg1 y Re, competirían con el LPS por la unión a TLR4. Este trabajo aporta evidencias acerca del reconocimiento directo de los principales componentes de PG por este receptor.

Si bien, numerosos estudios han evaluado las propiedades inmunomoduladoras de PG la mayoría de ellos se han limitado a caracterizar los cambios fenotípicos a nivel celular, mientras que un número reducido de estudios han analizado sus efectos a nivel molecular (Kang y Min, 2012). Los criterios comunes que se han utilizado para evaluar las propiedades inmunorregulatorias de PG han abarcado estudios sobre secreción de citoquinas, producción de anticuerpos, expresión de marcadores de superficie,

fagocitosis y citotoxicidad, existiendo escasa información sobre los componentes implicados en la vía de señalización (Kang y Min, 2012).

#### **1.5.5.3.1 Efecto inmunoprotector de *Panax ginseng* en un modelo murino de infección intramamaria**

En un estudio reciente realizado *in vivo* en ratones, Silvestrini y col. (2017), demostraron un efecto inmunoprotector del extracto de PG frente a IIM experimentales por *S. aureus*. La inoculación IM de 50 mg/ml de PG y posterior infección con *S. aureus* en ratones, indujo una disminución en el número de bacterias recuperadas de las GM infectadas. Además, se demostró un aumento en los niveles de expresión génica de los receptores TLR2 y TLR4 en las GM tratadas con PG y posteriormente infectadas con *S. aureus*, lo que consecuentemente se vio reflejado en un incremento en la expresión proteica y translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, conduciendo al aumento en la expresión génica de las citoquinas IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ . Sumado a esto, se observó un incremento en el número de monocitos-macrófagos detectados en las GM de ratones tratados con PG y desafiadas con *S. aureus* en relación a las GM tratadas con PG no infectadas.

#### **1.5.5.3.2 Antecedentes de la inoculación intramamaria de *Panax ginseng* en bovinos**

Trabajos previos han demostrado que la inoculación IM de 3 mg/ml de extracto de PG al momento de la interrupción de la lactancia, estimuló de manera significativa la expresión de citoquinas proinflamatorias en leche y en tejido mamario durante la primera semana de la involución, junto a un aumento en el RCS en leche, comportándose como un estimulante de las defensas innatas (Baravalle y col., 2010; 2011a). Sumado a sus propiedades como potenciador de la respuesta inmune innata en la GM bovina, se ha demostrado que la aplicación IM de PG, estimuló la remodelación del tejido

mamario, aumentando en forma significativa la apoptosis de las células epiteliales y estromales (Dallard y col., 2011) y modificando la expresión génica y proteica de componentes de la familia del factor de crecimiento análogo a insulina (IGF) (Dallard y col., 2011; 2013) lo cual contribuiría a acelerar el proceso de involución de la GM bovina. El mecanismo exacto por el cual PG estimula la inmunidad innata es desconocido. Sin embargo, en trabajos previos se demostró que las células epiteliales y estromales mamarias bovinas responden a los componentes de PG, aumentando la expresión génica de los receptores tipo *toll* (TLR2 y TLR4) y la expresión de proteínas. Además, se observó la activación del factor de diferenciación mieloide (MyD88) y la activación de NF- $\kappa$ B en el tejido mamario tratado con PG (Baravalle y col., 2015). Estos resultados proporcionan una alternativa de los posibles mecanismos mediante los cuales PG estimula la inmunidad innata durante la involución de la GM bovina. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar el efecto del extracto PG en la reducción de nuevas IIM en la GM bovina o controlar las infecciones existentes durante el periodo de secado.

## 2. OBJETIVOS



## 2.1 HIPÓTESIS GENERAL

Los ginsenósidos u otros componentes de la raíz de PG inoculados por vía intramamaria al momento de la interrupción de la lactancia, estimulan la respuesta inmune innata por parte del hospedador mediante su reconocimiento por receptores tipo *toll*, generando activación celular y posterior secreción de citoquinas, lo cual tendría influencia sobre la prevención de IIM durante el periodo de involución.

## 2.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de un extracto de PG como MRI y esclarecer su mecanismo de acción *in vitro* en cultivos de células bovinas. Asimismo, se propone evaluar la eficacia del compuesto, en combinación con antibióticos, para eliminar y prevenir nuevas IIM durante el periodo de involución mamaria y su efecto sobre la producción de leche en la lactancia siguiente.

## 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Caracterizar la respuesta inmune inducida, la expresión de receptores de reconocimiento tipo *toll* (TLR2/TLR4) y proteínas intervinientes en la cascada de señalización intracelular, en cultivos de macrófagos provenientes de secreción mamaria y células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T), luego del tratamiento con extracto de PG.

B) Evaluar *in vitro* el estado de activación de macrófagos y células epiteliales mamarias bovinas luego del tratamiento con PG y determinar si TLR2 y/o TLR4 intervienen en la activación mediante ensayos de inhibición de los mismos.

C) Evaluar si el extracto de PG modifica la adherencia e internalización de cepas de *Staphylococcus aureus* en MAC-T.

D) Evaluar el efecto de PG sobre la capacidad fagocítica y activación de macrófagos obtenidos de secreción mamaria bovina.

E) Evaluar mediante la realización de pruebas de campo con bovinos en producción, la eficacia del extracto de PG como un agente auxiliar de la terapia de vaca seca, administrado en combinación con un antimicrobiano, para eliminar IIM presentes al momento del inicio del periodo de secado y prevenir nuevas IIM durante esta etapa. Asimismo, evaluar el efecto sobre la producción de leche en la lactancia siguiente.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1 PREPARACIÓN DE *Panax ginseng*

Se utilizó un extracto seco de PG, conteniendo saponinas equivalentes a 27% expresados como ginsenósido Rg1 (lote N° 27988/2, Indena SPA, Milán, Italia). La solución stock fue preparada disolviendo el extracto en solución salina (0,89%) para llegar a una concentración final de 50 mg de extracto de PG/ml. Esta solución fue esterilizada por filtración (0,22  $\mu$ M), controlada microbiológicamente y diluida de acuerdo a las concentraciones de trabajo requeridas para cada ensayo.

Para descartar la posibilidad de contaminación con endotoxinas bacterianas todas las soluciones fueron testeadas con un kit comercial de lisado de amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod Inc., MA, EEUU).

### 3.2 CULTIVOS CELULARES

#### 3.2.1 Células epiteliales

Se utilizó la línea celular MAC-T (*Transformed mammary epithelial cells*) proveniente de células epiteliales alveolares mamarias bovinas transfectadas con SV-40 (Hyunh y col., 1991). Las MAC-T se cultivaron en frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Gibco BRL), insulina (5  $\mu$ g/ml), hidrocortisona (1  $\mu$ g/ml), penicilina (100 U/ml) y sulfato de estreptomicina (100  $\mu$ g/ml) (Sigma-Aldrich, Misuri, EEUU). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% y el medio de cultivo se renovó cada 48 hs. Cuando las MAC-T alcanzaron el 80-90% de confluencia, fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (2 x 10<sup>4</sup> cél./pocillo) y 24 pocillos (2 x 10<sup>5</sup> cél./pocillo) dependiendo del ensayo a realizar y mantenidas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 hs hasta el tratamiento con diferentes concentraciones de PG. Los ensayos con estas células se realizaron

siguiendo protocolos empleados en trabajos previos por miembros del grupo (Calvinho y col., 1996; Renna y col., 2014).

### **3.2.2 Macrófagos**

Los macrófagos se aislaron de secreciones mamarias provenientes de vacas Holstein con 10-14 días de involución mamaria y cuartos mamarios libres de infección de los establecimientos experimentales “Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja (EAGG)-UNL” de Esperanza, Santa Fe y de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (E.E.A Rafaela, INTA). Aproximadamente 25 ml de secreción mamaria se diluyeron 1:2 con PBS 1X (Anexo I) y se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos a 4°C usando una centrífuga de alta capacidad (RC6 plus, Sorvall, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU), luego la grasa fue cuidadosamente eliminada y el sedimento se lavó dos veces con PBS 1X y se centrifugó a 400 g durante 10 minutos. Se determinó la viabilidad de las células aisladas con azul de tripán y se resuspendió el contenido celular en una concentración de  $1 \times 10^6$  células viables/ml con medio RPMI completo (Anexo I). Posteriormente fueron cultivados en placas de 96 pocillos ( $5 \times 10^5$  cél./pocillo) y 24 pocillos ( $2 \times 10^6$  cél./pocillo) según el requerimiento de cada ensayo. A las 2 hs se realizó un lavado con PBS 1X con el fin de retirar restos de grasa y células no adheridas y luego fueron mantenidos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 hs, hasta el tratamiento con diferentes concentraciones de PG.

## **3.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR**

Con el objetivo de evaluar si el extracto PG generaba algún efecto citotóxico sobre MAC-T y macrófagos aislados de secreción mamaria, se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando un kit XTT comercial (*Cell Proliferation Kit II- XTT*, Roche, Basilea, Suiza). El XTT es un derivado de sales de tetrazolio que mide la viabilidad celular basada en la actividad de las enzimas mitocondriales en células vivas que reducen el XTT y se inactivan poco

después de la muerte celular. El XTT se reduce fácilmente a un producto de color naranja altamente soluble en agua el cual es proporcional al número de células vivas en la muestra y se puede cuantificar midiendo su absorbancia.

Células MACT ( $2 \times 10^4$  cél./pocillo) y macrófagos ( $5 \times 10^5$  cél./pocillo) fueron expuestos a 3 concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml). Luego de las 2, 8 y 24 hs pt en el caso de MAC-T y 24 hs pt en el caso de macrófagos (tiempo seleccionado luego de exponer las MAC-T durante 24 hs a PG y no evidenciar efecto citotóxico), los cultivos se trataron con la combinación de XTT *Labeling Reagent* y *Electron Coupling Reagent* para luego de 2 hs leer la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en espectrofotómetro (Microplate Reader, SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BGM/LABTECH, Ortemberg, Alemania). Paralelamente se mantuvieron células sin exposición al PG como control (sin PG=0 mg/ml). Cada condición se realizó por triplicado y se llevaron a cabo tres ensayos en forma independiente.

Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido del Test de Duncan como prueba de comparación múltiple. Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los Test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **3.4 CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR *Panax ginseng***

#### **3.4.1 Diseño experimental**

Para la caracterización de la respuesta inmune inducida en células bovinas tratadas con PG se utilizó placa de 24 pocillos, en ellas las MAC-T ( $2 \times 10^5$  cél./pocillo) fueron cultivadas con medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml), mientras que los

macrófagos ( $2 \times 10^6$  cél./pocillo) fueron cultivados con 3 mg/ml de PG (concentración seleccionada luego de evidenciar la respuesta generada en MAC-T y considerando los resultados previos obtenidos por el grupo de trabajo donde utilizaron esta concentración). En ambos casos, células cultivadas sin PG se mantuvieron como grupo control. A las 2, 6, 12 y 24 hs luego del tratamiento con PG se recolectaron los sobrenadantes para analizar la producción de citoquinas por inmunoensayo enzimático y las células fueron tratadas con Trizol para extraer el ARN total, y luego realizar la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real.

### **3.4.2 Determinación de los niveles de expresión génica de receptores de reconocimiento (TLR2 y TLR4), factor de transcripción (NF- $\kappa$ B), y citoquinas (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) por PCR en tiempo real.**

#### **3.4.2.1 Extracción de ARN total de células eucariotas**

La extracción de ARN total, en MAC-T y macrófagos tratados con diferentes concentraciones de PG se realizó mediante la metodología de Trizol<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific) a partir de 3 pocillos conteniendo las células de cada condición (placa de 24 pocillos) y siguiendo la metodología propuesta por el proveedor. Para favorecer la precipitación del ARN total se utilizó Glyco Blue<sup>™</sup> Coprecipitant (Invitrogen<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific). Previa evaluación de la integridad, pureza y concentración de ARN mediante espectrofotometría (SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BGM/LABTECH), las muestras se conservaron a -80°C hasta la realización de la transcripción reversa.

### 3.4.2.2 Obtención del ADNcopia (ADNc) mediante transcripción reversa (RT)

El ARN fue tratado con desoxirribonucleasa (DNasa) a los efectos de eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico y se llevó a cabo la retrotranscripción del mismo a ADNc mediante la técnica de RT.

Para el tratamiento con DNasa, la composición final del medio de reacción fue: ARN (cantidad constante de 2 ug), buffer de la enzima DNasa I (2 µl), enzima DNasa I (2 µl) (PBL Productos Bio-Lógicos, Bs As, Argentina) y agua DEPC (0,1%) (cantidad suficiente para completar un volumen final de reacción de 20 µl). Dicha reacción se llevó a cabo incubando a 20°C durante 15 min, luego se inactivó la enzima con EDTA 25 mM y se incubó 15 min a 65°C.

Para la RT, las reacciones se llevaron a cabo agregando cantidades constantes de ARN (previamente tratado con DNasa) a la mezcla de reacción conteniendo cebadores hexanucleótidos con secuencia al azar (1 µg/µl), dNTPs (25 mM), buffer de reacción para la enzima MMLV (5X First Strand Buffer), DTT (100 mM), inhibidor de ribonucleasas (40 U/µl) (RNase Out) y la enzima MMLV Reverse Transcriptase (200 U/µl). Los reactivos empleados fueron provistos por Invitrogen™. Las reacciones se realizaron en un termociclador de punto final (TECHNE TC-312, Stone, Reino Unido) utilizando un volumen final de 40 µl. Las condiciones aplicadas para la RT fueron 10 min a 25°C para la hibridación, 50 min a 37°C para la síntesis del ADNc y 15 min a 70°C para la inactivación de la enzima.

Los ADNc obtenidos se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización, y la cuantificación de los mismos se realizó por espectrofotometría (SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BGM/LABTECH).

### 3.4.2.3 Diseño de cebadores bovinos

Para evaluar los niveles de expresión de ARNm de receptores de la inmunidad innata y de citoquinas se diseñaron cebadores específicos para los genes que codifican para dichas proteínas.

Los cebadores fueron diseñados *on-line* empleando la página *Integrated DNA Technologies* [<http://www.idtdna.com/site>] y la herramienta para dicho diseño propuesta en *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, *Primer Designing Tool* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>]. Para su diseño, se tuvo en cuenta el tamaño del amplicón, la ubicación de cada cebador en la hebra molde, la secuencia, la temperatura de hibridación (o temperatura de annealing,  $T_a$ ), el porcentaje CG y la formación de heterodímeros, homodímeros y hairpins. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 1.

Cebador	Secuencia cebador 5' a 3'	Nº acceso NCBI	Tamaño amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
TLR2	S: CGATGACTACCGCTGTGACTC	NM_174197.2	224	58
	AS: CCTTCCTGGGCTTCCTCTT			
TLR4	S: AGCTTCAACCGTATCATGGCCTCT	AY634630	213	58
	AS: ACTAAGCACTGGCATGTCTCCAT			
NF-κB	S: GCTGAGTTGAGAGAGAGTAACC	NM001076409.1	111	62
	AS: CTTTCIGTTGTCACIGCTGC			
IL-6	S: GATGCAGTCTTCAAACGAGTGGGT	X57317	163	56
	AS: AGGTTTCTGACCAGAGGAGGAAT			
IL-8	S: ACACATTCCACACCTTCC	AF232704.1	184	60
	AS: CTTCCTCTCAGCTCTCTTC			
TNF-α	S: GCTTTACCTCATCTACTCACAG	EU276079.1	133	62
	AS: CTTCATGGCAGACAGGATG			
IL-1β	S: AGTCTGTCTGTACCCTAAC	NM_174093.1	113	61
	AS: GAGAGGGTTTCCATTCTGAAG			
β-actina	S: CGGAACCGCTCATTGCC	BT030480.1	290	60
	AS: ACCCACACTGTGCCCATCTA			

S: sentido, AS: antisentido, pb: pares de bases.

**TABLA 1.** Cebadores utilizados para determinar niveles de expresión génica de receptores, factor de transcripción y citoquinas de la inmunidad innata.

#### 3.4.2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa de punto final (PCR)

En primera instancia, tanto como para evaluar la obtención de ADNc, como para verificar la capacidad de hibridación para cada par de cebadores diseñados, se realizó una PCR de punto final. Brevemente, cada PCR se llevó a cabo resuspendiendo el ADNc en una mezcla de reacción conteniendo buffer Taq 10X (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4),  $Cl_2Mg$  (1,5 mM), dNTPs (25 mM), cebador sentido (20  $\mu M$ ), cebador antisentido (20  $\mu M$ ), Taq polimerasa (5

U/ $\mu$ l) y agua DEPC (0,1%) hasta completar un volumen final de 25  $\mu$ l. Los reactivos empleados fueron provistos por Invitrogen™. Los protocolos finales utilizados fueron:

- Desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min.
- 35 ciclos de desnaturalización 94°C por 45 seg, hibridación: 58°C (TLR2), 58°C (TLR4), 62°C (NF- $\kappa$ B), 56°C (IL-6), 60°C (IL-8), 62°C (TNF- $\alpha$ ), 61°C (IL-1 $\beta$ ) y 60°C ( $\beta$ -actina) durante 30 seg, y extensión a 72°C durante 1 min 30 seg.
- Extensión final 72°C por 10 min.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador TECHNE TC-312. Al mismo tiempo, se amplificó un control positivo (formado por ADNc proveniente de un pool de muestras de ganglio bovino provenientes de frigorífico) para evaluar la efectividad de la técnica y un control negativo (agua DEPC) para chequear el funcionamiento de los reactivos empleados. Los productos obtenidos de las PCR fueron sembrados y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% conteniendo solución tamponada TAE 1X (Anexo I) y colorante de ácidos nucleicos Gel Red 1X (Biotium, CA, EEUU). Paralelamente a las muestras, se sembró 1  $\mu$ l del marcador de pares de bases (Ladder 100 pb, PBL Productos Bio-Lógicos) con el objetivo de determinar la correspondencia del producto amplificado con el tamaño molecular (Tabla 1). Las bandas obtenidas se visualizaron en el gel bajo luz UV de un transiluminador (Labnet, Edison, EEUU).

#### **3.4.2.5 Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (Real time)**

Se realizó PCR en tiempo real utilizando SYBR Green I (Invitrogen™) (Pfaffl, 2001) en el termociclador de tiempo real StepOne Applied Biosystems (Life Technology, California, EEUU). Los genes evaluados en MAC-T fueron TLR4, NF- $\kappa$ B, IL-6 y TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . Con respecto a TLR2 e IL-8 en estas células, no se logró optimizar las condiciones de PCR en tiempo real al momento de presentar el manuscrito de tesis para su evaluación. Los genes evaluados en

macrófagos fueron TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Para evaluar la eficiencia (E) de reacción, se realizaron las curvas estándares correspondientes a cada uno de los genes a analizar. Se realizaron diluciones seriadas del ADNc, por duplicado, las cuales fueron corridas en el termociclador de tiempo real StepOne. Al mismo tiempo, se amplificó un control negativo, también por duplicado, en el cual se reemplazó el ADNc por agua DEPC estéril. Una vez finalizada la reacción, se confeccionó una recta con los valores obtenidos para cada dilución, cuya pendiente indica la eficiencia (E) de la reacción. También se determinó el valor umbral (*threshold*), el rango dinámico y la concentración de ADNc más apropiada para llevar a cabo la cuantificación posterior de las muestras.

Los protocolos finales utilizados fueron:

- Desnaturalización inicial 98°C por 3 min.
- 40 ciclos de desnaturalización a 98°C por 5 seg, hibridación a 58°C por 20 seg (TLR2), 58°C por 15 seg (TLR4), 62°C por 30 seg (NF- $\kappa$ B), 56°C por 15 seg (IL-6), 60°C por 25 seg (IL-8), 62°C por 25 seg (TNF- $\alpha$ ), 61°C por 30 seg (IL-1 $\beta$ ) y 60°C por 15 seg ( $\beta$ -actina), extensión a 72°C por 20 seg.
- Lectura de fluorescencia a 70°C.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo 4  $\mu$ l de ADNc y 16  $\mu$ l de una mezcla de reacción: buffer Phire 5X, MgCl<sub>2</sub> (50 mM), dNTPs (25 mM), cebador sentido (20  $\mu$ M), cebador antisentido (20  $\mu$ M), SYBR Green I y ADN Polimerasa Phire Hot Start II, llevando a volumen con agua DEPC. Los reactivos empleados fueron provistos por Invitrogen™. Todas las muestras se corrieron por duplicado y paralelamente se corrió una muestra control correspondiente a una de las diluciones realizadas para cada una de las curvas estándares con el objetivo de verificar la eficiencia de cada corrida y un control negativo. La cuantificación de las muestras se realizó utilizando el método Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) usando  $\beta$ -actina como gen de referencia o normalizador (Livak y Schmittgen, 2001).

Se aplicó el Modelo Lineal General para el análisis estadístico. A través de este modelo se evaluaron los efectos principales del tratamiento, del tiempo de muestreo y de la interacción entre ambos factores (tratamiento\*tiempo). Cuando la interacción fue significativa se realizó el Test de Duncan para comparar medias individuales. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **3.4.3 Cuantificación de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4) por inmunoensayo enzimático (ELISA)**

Las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4 en los sobrenadantes de MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG para los distintos tiempos de incubación se cuantificaron utilizando kits de ELISA comerciales (IL-1 $\beta$  bovina, IL-6 bovina, IL-4 bovina, Thermo Scientific Inc., Rockford, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La placa se sensibilizó durante la noche con el anticuerpo de captura y se bloqueó con solución de bloqueo (Anexo I). En los pocillos correspondientes se colocaron las muestras de sobrenadantes por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante una hora (IL-1 $\beta$  e IL-6) o una hora y media (IL-4). Para realizar la cuantificación, se realizó una curva estándar a partir de una concentración conocida de cada citoquina (IL-1 $\beta$ : 4000 pg/ml, IL-6: 5000 pg/ml, IL-4: 1000 pg/ml). Luego de sucesivos lavados con buffer de lavado (Anexo I), se incubó con el anticuerpo de detección durante 1 h a TA. Posteriormente, se realizaron sucesivos lavados y se incubó con peroxidasa-estreptavidina durante 30 min a TA. La reacción fue evidenciada mediante la incubación con el cromógeno (TMB) durante 20 minutos, y luego detenida con TMB solución de frenado. Las lecturas se realizaron a 450 nm en un lector de ELISA (SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BGM/LABTECH).

Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó el Modelo Lineal General, seguido del Test de Duncan como prueba de comparación múltiple. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### 3.4.4 Determinación intracelular de IL-4 por citometría de flujo

Considerando los resultados obtenidos por la técnica de ELISA, y que no existen en la bibliografía estudios previos que constaten que las células epiteliales mamarias bovinas sintetizan IL-4, la producción intracelular de esta citoquina en MAC-T fue evaluada por citometría de flujo.

Las células fueron incubadas en placas de 24 pocillos ( $2 \times 10^5$  cél./pocillo) por 24 hs a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> con PG (3 mg/ml) y sin PG (control-basal). El control positivo de la producción de citoquinas se realizó colocando a determinados pocillos 50 ng/ml forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) más 1 µg/ml de ionomicina (Io, Sigma-Aldrich), aplicándose este estímulo en las últimas 6 horas del cultivo. A su vez, un inhibidor del transporte de proteínas que contiene monensina (BD GolgiStop™, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EEUU) se aplicó a todas las condiciones con el objetivo de acumular la producción de citoquina dentro de la célula.

Las MAC-T fueron tratadas con 0,25% de tripsina, 0,1% EDTA y recolectadas en tubos de 1,5 ml. Previamente a la marcación las células fueron fijadas y permeabilizadas con LEUCOPERM™ (Bio-Rad Laboratories, California, EEUU) y marcadas por 1 h con un anticuerpo monoclonal anti-IL-4 conjugado con FITC (8 µg/ml) o con el control de isotipo (Bio-Rad Laboratories) sobre hielo y en la oscuridad. Finalmente las células fueron lavadas con FACS (Anexo I) y resuspendidas en fluido de enfoque (Attune®, Life Technology) para adquirir por citómetro de flujo (Attune NxT, Life Technology). Se analizó el porcentaje de MAC-T IL-4+ mediante el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EEUU).

Se aplicó el ANOVA, seguido del Test de Duncan como prueba de comparación múltiple. Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los Test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **3.5 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE TLR2 y TLR4**

Uno de los avances más importantes en biología ha sido el descubrimiento de los pequeños ARN de interferencia (siARN), capaces de regular la expresión de los genes mediante un fenómeno conocido como ARNi (ARN de interferencia). El silenciamiento génico se da por la interacción de complejos enzimáticos en el citoplasma con pequeñas moléculas de siRNA, las cuales, actúan sobre el ARNm endógeno impidiendo que sea traducido a proteína (Fire y col. 1998, Carthew y Sontheimer, 2009).

Con la finalidad de determinar si TLR2 y/o TLR4 intervienen en la activación de macrófagos luego del tratamiento con PG se comenzó con la puesta a punto de la metodología de silenciamiento génico mediante siARN para ambos receptores. Se realizaron numerosos ensayos preliminares para evaluar la viabilidad de los macrófagos en presencia de siARN, las concentraciones de siARNs adecuadas, los correspondientes controles de técnica a utilizar y los tiempos en contacto de las células con siARNs que generaren el mayor silenciamiento de los receptores evaluados.

#### **3.5.1 Cultivos celulares**

Macrófagos provenientes de secreciones mamarias de 10-14 días de involución, obtenidos como se detalla previamente en el punto 3.2.2, fueron cultivados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 2 hs en placa de 24 y 96 pocillos (según el ensayo) en medio RPMI suplementado con gentamicina 200 ug/ml.

#### **3.5.2 Ensayos de viabilidad celular**

Con el objetivo de evaluar si los siARNs generaban citotoxicidad sobre los macrófagos, se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando un kit de XTT comercial (*Cell Proliferation Kit II- XTT*, Roche).

Para ello, cuando los cultivos de macrófagos dispuestos en placas de 96 pocillos ( $5 \times 10^5$  cél./pocillo) lograron la adherencia a la placa (2 hs), se incubaron con las mezclas de siARN más lipofectamina (Lipofectamine® RNAiMAX, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) (según especificaciones técnicas del proveedor) y se mantuvieron en contacto durante 48 horas. Transcurrido este periodo, las células fueron tratadas con la combinación de XTT Labeling Reagent y Electron Coupling Reagent. Luego de 2 hs se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en espectrofotómetro (SPECTROstarNano, BGM/LABTECH). Las condiciones que se evaluaron fueron: 75 nM siARN TLR2, 75 nM siARN TLR4, 75 nM siControl negativo (1), 75 nM siControl negativo (2) y células sin tratamiento (basales). El detalle de los siARNs utilizados se muestra en la tabla 2. Cada condición se realizó por triplicado y se llevaron a cabo tres ensayos en forma independiente.

Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA, los supuestos de normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Posteriormente, se realizó el test de Duncan para identificar cuales grupos diferían entre sí en forma significativa. El nivel de significancia se fijó en  $p < 0,05$ .

siARN	Secuencia cebador 5' a 3'	Proveedor
siARN TLR2	S: GGACAGAAUUAGACACCUAAU	Thermo Fisher Scientific
	AS: UAGGUGUCUAAUUCUGUCCUU	
siARN TLR4	S: GAGUAUAUCUUUAGGAAGUUU	Thermo Fisher Scientific
	AS: ACUCCUAAAGAUUACUCUU	
siControl negativo (1)	Silencer™ Negative Control No. 1 siRNA	Ambion® (Thermo Fisher Scientific).
siControl negativo (2)	AllStars Negative Control siRNA	Qiagen® (Tecnolab)

S: sentido, AS: antisentido

**TABLA 2.** siARNs y siControl negativo (1 y 2) utilizados en los ensayos de silenciamiento génico de receptores tipo *Toll*.

### 3.5.3 Ensayos para la puesta a punto de la metodología de silenciamiento génico en macrófagos bovinos mediante siARN

Todos los ensayos y sus variables se realizaron siguiendo la metodología general que se describe a continuación. Brevemente, una vez que las células ( $2 \times 10^6$  macrófagos/pocillo) en medio de cultivo RPMI y libre de antibiótico lograron adherirse a la placa (2 hs), fueron tratadas con una mezcla de lipofectamina (Invitrogen TM), más siARNs (TLR2 y TLR4) o con los siControl negativo (1 y 2) (Tabla 2) en medio de cultivo Opti-MEM® (Gibco BRL), siguiendo las indicaciones del proveedor. Las células cultivadas sin siARN se comportaron como grupo control (basales). Luego de transcurridas 24/48 hs las células fueron tratadas con Trizol para extraer el ARN total siguiendo la metodología descrita en el punto 3.4.2.1 de esta sección.

#### 3.5.3.1 Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa

La puesta a punto del silenciamiento de TLR2 y TLR4 se llevó a cabo mediante la evaluación de los niveles transcripcionales de sus genes. Para ello, a partir de los ARNs extraídos se realizó RT-PCR en tiempo real para TLR2, TLR4 y  $\beta$ -actina como gen normalizador (Tabla 1). Las metodologías utilizadas fueron las descritas anteriormente en el punto 3.4.2.2 (RT) y 3.4.2.5 (PCR en tiempo real) de esta sección.

La cuantificación de las muestras se realizó utilizando el método Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). El porcentaje de silenciamiento y las comparaciones con los siControl negativo (1 y 2) se realizaron en base a las siguientes relaciones:

\*células silenciadas/células sin tratar (basales)

\*células tratadas con siControl negativo/células sin tratar (basales)

A continuación se detallan tres ensayos realizados para determinar las condiciones óptimas de silenciamiento para TLR2 y TLR4. En todos los ensayos se mantuvieron células sin tratamiento como grupo basal.

### **3.5.3.1.1 Determinación de la concentración adecuada de siARN**

En una primera instancia, se probaron diferentes concentraciones de siARN: 50, 75, 100 nM, para los siARNs TLR2, TLR4 y siControl negativo (1). El silenciamiento se realizó durante 48 hs siguiendo la metodología general descrita en el punto 3.5.3 de esta sección.

### **3.5.3.1.2 Evaluación del siControl negativo adecuado y el tiempo de silenciamiento**

En una segunda instancia y considerando los resultados del ensayo 1, en el ensayo 2, se evaluó la concentración de 75 nM para ambos siARNs (TLR2 y TLR4) y se compararon los siControl negativo (1 y 2) (Tabla 2). Por otro lado, como el objetivo del silenciamiento en este trabajo fue analizar el efecto de PG en células silenciadas, y teniendo en cuenta que las células debían estar en contacto con PG por 24 hs, se modificó el tiempo de silenciamiento de 48 hs a 24 hs.

### **3.5.3.1.3 Silenciamiento génico y tratamiento con *Panax ginseng***

En este ensayo, para ambos genes (TLR2 y TLR4), se empleó la concentración de siARN de 75 nM, el siControl negativo (1) y el silenciamiento se realizó por 24 hs. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo con los siARNs y las células se incubaron con 3 mg/ml de PG en medio de cultivo RPMI completo (Anexo I) durante 24 hs. Para evaluar si el silenciamiento permanecía activo luego de 24 hs de retirar los siARNs, pocillos sin PG se mantuvieron durante esas 24 hs y se trataron de la misma manera que los pocillos con PG.

Cabe aclarar que de los ensayos para la puesta a punto de la metodología de silenciamiento génico no se ha realizado el análisis estadístico

correspondiente por contar con valores de un ensayo hasta el momento de presentar el manuscrito para su evaluación.

### **3.6 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA INTERNALIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* A MAC-T**

#### **3.6.1 Preparación de los inóculos**

En forma previa a las curvas de crecimiento y los ensayos de internalización se realizó la puesta a punto y recuento en placa de las unidades formadoras de colonia (UFC) de las dos cepas bacterianas a emplear; la cepa de referencia Newbould 305 (ATCC 29740) la cual induce experimentalmente y de forma reproducible mastitis crónicas con síntomas leves (Hensen y col, 2000; Bannerman y col., 2004; Bouchard y col., 2012) y la cepa 5011, esta última aislada de una vaca con mastitis subclínica persistente, con alta adaptación a la GM bovina y con alta capacidad para invadir las CEM utilizada en ensayos previos por miembros del grupo (Pereyra y col., 2016).

Para realizar esta determinación las cepas de *S. aureus* conservadas a -80°C fueron reactivadas mediante el sembrado de estría en medio agar base (Anexo I) durante 24 hs. Al día siguiente, se tomaron con el ansa estéril tres colonias y se descargaron en 60 µl de TSC (Tripteína Soya Caldo) (Anexo I), luego se tomaron 20 µl de esa suspensión y se sembraron en otros 5 ml de caldo TSC, el cual se incubó a 37°C en agitación constante de 150 rpm. Transcurridas 16 hs, se tomaron 50 µl de la suspensión y se sembraron en 4950 µl de TSC, que se incubó durante 2 hs a 37°C en agitación constante de 150 rpm. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base 10 y se tomaron 20 µl de las últimas cuatro diluciones que fueron sembradas por duplicado en placas de agar manitol salado (Anexo I) e incubadas en estufa a 37°C por 24 hs. Los recuentos de las UFC se realizaron en las diluciones donde fue posible contar entre 30 y 40

colonias. Se realizaron triplicados de cada dilución y el ensayo se repitió 3 veces.

### 3.6.2 Curvas de crecimiento bacteriano

Para analizar si el extracto de PG modificaba la internalización de las cepas de *S. aureus* en MAC-T, se comenzó por determinar si diferentes concentraciones de PG adicionadas al medio de cultivo modificaban el crecimiento bacteriano. Estos ensayos se llevaron a cabo mediante la realización de curvas de crecimiento durante 24 hs de las dos cepas de *S. aureus*. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos y de acuerdo a un patrón de distribución de 2 grupos (uno por cada cepa) se colocaron en los pocillos diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml) diluidas en caldo Mueller-Hinton (M-H) pH normal (7,2 - 7,4) y pH modificado (6,7, similar al de la leche bovina) ajustado con HCl 1N (Anexo I). Los pocillos se inocularon en una dilución 1/100 con las cepas de *S. aureus* a ensayar y a su vez, se dejaron pocillos sin PG como control y pocillos blanco solo con caldo. Las lecturas de densidades ópticas (DO) a 630 nm se realizaron cada una hora en el equipo Multi-Mode Microplate Reader Synergy TM HT (Biotek®, Vermont, EEUU) durante 24 hs a una temperatura de 37°C. Cada condición se hizo por duplicado y se realizaron tres ensayos individuales.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando ANOVA factorial de medidas repetidas, valores de  $p < 0,001$  fueron considerados estadísticamente significativos. El Test de Duncan se utilizó como prueba de comparación múltiple, en este, valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### 3.6.3 Ensayos de internalización

Se evaluó el efecto de PG sobre la internalización de las cepas Newbould 305 (ATCC 29740) y cepa 5011 de *S. aureus* a las MAC-T. Los ensayos se realizaron siguiendo la metodología de Pereyra y col. (2016) con modificaciones.

Previo a la infección con las cepas de *S. aureus*, las MAC-T fueron cultivadas en placas de 24 pocillos ( $2 \times 10^5$  cél./pocillo) con PG (0,5, 1 y 3 mg/ml) en medio completo (Anexo I) por 24 hs, a su vez se dejaron células sin PG como grupo control. Transcurridas las 24 hs del tratamiento, se extrajo el medio con PG y se realizó el co-cultivo con las bacterias para lo cual se utilizó una Multiplicidad de Infección (MOI) de 100:1 bacterias por célula. La selección de la MOI se realizó teniendo en cuenta resultados previos del grupo (Pereyra y col., 2016). Luego de 2 hs de contacto de MAC-T con las bacterias en condiciones de 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, las células fueron lavadas y tratadas con 300 µg/ml de gentamicina (Laboratorios Over SRL, Santa Fe, Argentina) en medio de cultivo DMEM/RPMI 50/50 (Anexo I) por 2 hs, transcurrido este lapso los sobrenadantes fueron recolectados y sembrados en agar manitol salado para verificar la muerte de las bacterias no internalizadas. Luego de sucesivos lavados con PBS 1X las células fueron lisadas con tritón X-100 (Amersham, Arlington Heights, IL, EEUU) con el objetivo de liberar las bacterias intracelulares. Al lisado de MAC-T conteniendo las bacterias se le realizó diluciones seriadas en base 10 las cuales se sembraron en agar manitol salado e incubaron a 37°C durante toda la noche para luego realizar el recuento de UFC totales de bacterias según el método de recuento de colonias estándar (Miles y col. 1938). Las distintas condiciones de ensayo se realizaron por triplicado y el experimento fue repetido tres veces. Los resultados se expresaron como log<sub>10</sub> de UFC/ml de bacterias intracelulares recuperadas de MAC-T.

El efecto de PG sobre la internalización de *S. aureus* fue analizado mediante ANOVA. Los supuestos de normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los Test de Kolmogorov-

Smirnov y Levene, respectivamente. Como prueba de comparaciones múltiples se utilizó el Test de Duncan. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **3.7 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS**

#### **3.7.1 Ensayos de fagocitosis**

Para evaluar el potencial efecto de PG sobre la actividad fagocítica en macrófagos bovinos se realizaron ensayos de fagocitosis mediante citometría de flujo usando dos cepas de *S. aureus* Newbould 305 y cepa 5011 (utilizada en los ensayos de internalización) marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC: *Fluorescein IsoTioCyanate*).

La marcación de las bacterias se realizó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente y ligera agitación, 1 ml de PBS 1X conteniendo FITC (10 mg/ml en dimetilsulfóxido) y  $1 \times 10^9$  UFC/ml de ambas cepas bacterianas (Renna y col., 2014). Luego de sucesivos lavados, las bacterias fueron resuspendidas a volumen inicial con PBS 1X.

Los macrófagos aislados de secreción mamaria detallado en el apartado 3.2.2 fueron colocados en tubos tipos eppendorf ( $1 \times 10^6$  cél./tubo) y luego tratados con 3 mg/ml de PG en medio RPMI completo (Anexo I) o con medio de cultivo solo (grupo control) por 2 hs en agitación suave a 37°C. Luego del tratamiento se extrajo el medio con PG y los macrófagos fueron incubados con las cepas Newbould 305 o 5011 marcadas previamente con FITC en una MOI de 100:1 bacterias por célula a 37°C por 30 minutos. La fagocitosis se frenó adicionando CINA 0,85%/EDTA 0,04 %. Las células fueron centrifugadas a 400 g por 5 minutos, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para la determinación de ON (óxido nítrico) y los pellets se resuspendieron en fluido de enfoque (Attune®, Life Technology) para su adquisición en el citómetro de flujo Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer A24860 (Life Technology).

### 3.7.1.1 Selección de la población de macrófagos y análisis de la fagocitosis

Previo al análisis de los ensayos de fagocitosis y con el objetivo de identificar la población de macrófagos, un grupo de células fueron marcadas con anti-CD14 (APC anti-human CD14, Clon M5E2, BioLegend®, CA, EE.UU., 12 µg/ml) por 30 minutos en hielo y al abrigo de la luz. Luego de centrifugar y resuspender el pellet en fluido de enfoque (Attune®, Life Technology) se realizó la adquisición por citometría de flujo (Attune NxT, Life Technology).

La población de macrófagos se definió según los parámetros de tamaño (*side scatter*) y complejidad citoplasmática (*forward scatter*) como Región 1 (R1), dentro de esta región se identificó la población positiva para CD14 (R2) en la cual se evaluó el porcentaje de fagocitosis de macrófagos con bacterias asociadas (adheridas y/o internalizadas) y el parámetro de Intensidad de Fluorescencia Media (IFM), este último utilizado como una estimación del número de bacterias asociadas por célula positiva (Zetterlund y col., 1998).

El análisis de fagocitosis se realizó utilizando el software FlowJo (Tree Star), y para el análisis estadístico se aplicó prueba t de Student para cada bacteria por separado. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### 3.7.2 Producción de especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS)

Como parámetro de activación de macrófagos frente a PG se evaluó la producción de ROS intracelular mediante citometría de flujo usando hidrotidina (HE) (Yang y Shen, 2007). Una vez completado el ensayo de fagocitosis, los macrófagos destinados a este fin, se incubaron con HE (1 µM) (Molecular Probes, Invitrogen™) en PBS 1X durante 15 min a 37°C al abrigo de la luz. La HE es una sonda no fluorescente, permeable a las células, que se convierte en etidio por ROS (principalmente por el anión superóxido) de una manera dependiente de la concentración, dando como resultado la emisión de

fluorescencia, la cual se detectó por citometría de flujo (Attune NxT, Life Technology) en el canal BL3 usando un filtro de paso de banda de 695/40 nm.

El análisis del porcentaje de macrófagos que producen ROS y la IFM (que estima la cantidad de ROS producida por célula) se realizó mediante el programa FlowJo (Tree Star). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba t de Student y valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### 3.7.3 Producción de óxido nítrico (ON)

Otro parámetro indicador de activación de macrófagos frente a PG que se evaluó fue la producción de ON. Para ello, los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de fagocitosis fueron utilizados para determinar la concentración de ON. Las condiciones de tratamiento fueron las siguientes: macrófagos tratados con 3 mg/ml de PG (Basal + PG); macrófagos sin tratamiento (Basal); macrófagos tratados con 3 mg/ml de PG + cepas de *S. aureus* Newbould 305 o 5011 (Newbould 305 + PG o 5011 + PG); macrófagos co-cultivados con las cepas Newbould 305 o 5011 (Newbould 305 o 5011). Los sobrenadantes fueron filtrados a través de una membrana 0,22  $\mu\text{M}$  para luego evaluar la concentración de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) mediante la reacción de Griess (Thermo Fisher Scientific) tal como lo describen Denis y col. (2006) y Gutiérrez-Barrosoa y col. (2008). El reactivo de Griess fue preparado antes de la medición mezclando iguales volúmenes de la solución A (10% sulfanilamida, 40% ácido fosfórico) y de la solución B (1% N-(1-naftilo) dihidrocloruro de etilendiamina). Los niveles de nitrito, indicativos de la producción de ON, fueron evaluados con la lectura de densidades ópticas de cada muestra a 550 nm en un espectrofotómetro y posterior comparación con una curva estándar de nitrito de sodio realizada en forma conjunta con las muestras evaluadas (0,78–100  $\mu\text{M}$ ).

El análisis estadístico se llevó cabo utilizando ANOVA, seguido del Test de Duncan como prueba de comparación múltiple. Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se

comprobaron por los Test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **3.8 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE *Panax ginseng* MEDIANTE PRUEBAS DE CAMPO**

Previo a las pruebas de campo en bovinos se realizaron ensayos de microdilución en placa para determinar el efecto de diferentes concentraciones de PG sobre la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de cefalexina. Este antibiótico fue seleccionado para la preparación de las formulaciones de aplicación IM que se administraron a animales en producción al momento del secado porque es una cefalosporina de primera generación recomendada para el tratamiento de mastitis por cocos gram positivos en general y está indicada para el tratamiento de *S. aureus* que pueden ser penicilino-resistentes (Pyörälä S, 2009).

#### **3.8.1 Ensayos de microdilución en caldo**

##### **3.8.1.1 Preparación del inóculo**

Para los ensayos de microdilución en caldo se emplearon dos cepas de *S. aureus*, una de referencia ATCC 29213 y otra de campo (cepa 17) aislada de mastitis bovina. Las bacterias conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron reactivadas mediante el sembrado en estría en medio agar base y posterior incubación durante 24 hs en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido ese tiempo se tomó con el ansa una colonia y se descargó por las paredes de un tubo de vidrio conteniendo agua ultrapura estéril, de esa manera se realizaron lecturas con un densitómetro hasta obtener una turbidez equivalente a una escala de 0,5 Mc Farland (concentración establecida de  $1 \times 10^8$  UFC/ml). Se realizó una dilución 1/10 (450  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura con 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión al 0,5 Mc Farland). Posteriormente a cada pocillo se le inoculó 5  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana obteniendo una

concentración final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml por pocillo. Para corroborar dicha concentración, se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ l de cada pocillo control y se realizaron diluciones seriadas en base 10 que se sembraron por duplicado (20  $\mu$ l) en placas de agar base. Tras la incubación durante 24 hs se procedió a la lectura de UFC totales de bacterias según el método de recuento de colonias estándar de Miles y col. (1938).

### 3.8.1.2 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la cefalexina

Se evaluó el efecto de PG sobre la CIM de la cefalexina utilizando la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 29213 y la cepa 17 (aislada de mastitis bovina). El ensayo se realizó en placas de fondo en U de 96 pocillos (12 columnas numeradas del 1 al 12 x 8 filas con letras desde la A a la H). En cada una de las dos primeras filas A y B se realizaron 11 diluciones seriadas en base 2 de la cefalexina (Allignani Hermanos SRL, Santa Fe, Argentina) en caldo M-H sin PG y un pocillo control (columna 12) de caldo sin antibiótico. Con este esquema de diluciones en la columna 1 se ubicó la concentración más alta del antibiótico (64  $\mu$ g/ml) y en la columna 11 la más baja (0,0625  $\mu$ g/ml). En las filas C y D se adicionó al caldo PG en una concentración de 0,5 mg/ml. Por otra parte, en las filas E y F, se adicionó PG en una concentración de 3 mg/ml. El volumen final del caldo en cada pocillo fue de 100  $\mu$ l.

La concentración final del inóculo fue de  $5 \times 10^5$  UFC/ml (Apartado 3.8.1.1). Además de los pocillos de control de crecimiento (pocillos sin antibiótico), se prepararon controles negativos (caldo sin inocular). Tras la incubación de 24 hs se procedió a la lectura de los resultados visualmente y mediante determinación de DO por espectrofotometría en una longitud de onda de 600 nm (Microplate Reader, SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BGM / LABTECH). Se determinó como CIM de la cefalexina a la menor concentración del antibiótico en la cual no se observó crecimiento bacteriano a simple vista (botón de crecimiento) luego de las 24 hs, a su vez dichos pocillos coincidían con valores de DO menores a 1.

El análisis estadístico y las tablas que se muestran en resultados se realizaron con los valores de DO. El efecto de PG sobre la CIM de la cefalexina fue analizado mediante ANOVA, y posteriormente se realizó un Test de Duncan para identificar cuales concentraciones diferían entre sí en forma significativa. Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los Test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **3.8.1.3 Concentración Bactericida Mínima (CBM) de la cefalexina**

Se evaluó el efecto de PG sobre la CBM de la cefalexina utilizando la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 29213. Se cultivaron en agar base 20  $\mu$ l de los pocillos considerados CIM y aquellos sucesivos desde CIM hasta la fila 1 (pocillos con mayor concentración de antibiótico), transcurridas 24 hs se realizó la lectura visual de las UFC.

Se determinó como CBM de la cefalexina a la menor concentración del antibiótico en la cual no se observó crecimiento bacteriano luego de las 24 hs, en otras palabras, la menor concentración de antibiótico capaz de producir la muerte de más del 99,9% de los organismos viables. La CBM se expresó en  $\mu$ g/ml. Cada condición se realizó por duplicado y los ensayos por triplicado.

## **3.8.2 Ensayos de eficacia de *Panax ginseng* mediante pruebas de campo**

### **3.8.2.1 Animales**

Se empleó un total de 102 vacas Holstein en producción pertenecientes al rodeo experimental de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja (EAGG - UNL) de Esperanza, Santa Fe y al rodeo experimental de la Estación Experimental Agropecuaria de Rafaela (INTA), mantenidas bajo un régimen de pastoreo de alfalfa, recibiendo concentrados en la sala de ordeño (6 kg

divididos en los dos ordeños diarios). Las lactancias fueron interrumpidas entre 45 y 60 días antes de la fecha probable de parto, en dicho periodo de secado, los animales fueron alojados en potreros destinados a tal categoría, para luego ser alojados en corrales de pre-parto. Luego de 12 hs del parto las vacas fueron incorporadas al rodeo general.

### **3.8.2.2 Diseño experimental**

El total de los animales (n=102) fueron divididos al azar en dos grupos experimentales. La unidad experimental fue el cuarto mamario (n=432). A cada grupo se le asignó un tratamiento diferente al momento de la interrupción de la lactancia (secado):

- Grupo 1: vacas tratadas en los cuatro cuartos con una preparación antibiótica de aplicación IM conteniendo cefalexina (100 mg por jeringa de 10 ml en un vehículo oleoso de liberación lenta).
- Grupo 2: vacas tratadas en los cuatro cuartos con una preparación de aplicación IM conteniendo 3 mg/ml de PG en un vehículo hidrosoluble de liberación rápida (volumen final 10 ml), más la preparación antibiótica de aplicación IM conteniendo cefalexina igual al grupo 1.

La concentración de 3 mg/ml de PG fue elegida teniendo en cuenta trabajos previos realizados por el grupo (Baravalle y col. 2010, 2011, 2015).

Las formulaciones de aplicación IM fueron elaboradas bajo estrictas normas de calidad y provistas por el Laboratorio Allignani Hermanos S.R.L.

#### **3.8.2.2.1 Toma y procesamiento de muestras**

Se tomaron muestras de secreción mamaria para cultivos bacteriológicos el último día del ordeño previo a la administración del tratamiento (muestra pre secado), y al pos parto temprano (dentro de las 24 hs posteriores al parto). Para la toma de muestra los pezones fueron desinfectados adecuadamente con

un algodón embebido en alcohol 70°, se descartaron los primeros chorros y se colectaron aproximadamente 5 ml de secreción mamaria en tubos estériles (Figura 6.1). Las muestras fueron refrigeradas hasta su traslado al laboratorio.

### 3.8.2.2 Procedimiento de aplicación intramamaria

Luego del último ordeño de la tarde se procedió a la desinfección de la punta del pezón con un algodón embebido en alcohol 70° y posteriormente se realizó la aplicación IM de la formulación introduciendo en el canal del pezón el extremo de la cánula de la jeringa aplicadora (Figura 6.2). En las vacas del grupo 2, se utilizaron dos jeringas diferentes que se aplicaron de manera sucesiva, la primera conteniendo la formulación de PG y la segunda conteniendo la formulación antibiótica. Entre cada aplicación, antes de introducir la cánula en el canal del pezón, se tomó la precaución de desinfectar cuidadosamente la punta del pezón con alcohol 70°.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas vigentes sobre experimentación animal (*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Federation of Animal Science Societies, Third edition, 2010*) y sometidos a la aprobación del comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL.



FIGURA 6. Obtención de muestra de leche previo al tratamiento (1).  
Aplicación IM del tratamiento (2).

### 3.8.2.3 Aislamiento e identificación de microorganismos

El diagnóstico de IIM se realizó mediante el aislamiento de organismos patógenos en placas de agar sangre (Anexo I) luego del sembrado por estría e incubación durante 24 hs en estufa a 37°C.

La identificación de los organismos se realizó en base a la morfología de las colonias y a la presencia o ausencia de hemólisis. En el caso del género *Staphylococcus* el diagnóstico definitivo se realizó a partir de la coloración de Gram, prueba de coagulasa y catalasa. Para el género *Streptococcus* el diagnóstico definitivo se realizó a partir de la coloración de Gram, prueba de catalasa, CAMP test, hidrólisis de la esculina, del hipurato, y el crecimiento en caldo CINa 6,5%. En cuanto a bacterias Gram negativas la diferenciación presuntiva se realizó en medio Triple Azúcar Hierro (TSI) y medio Sulhídrico Indol Motilidad (SIM). Las técnicas de aislamiento e identificación de especies bacterianas se encuentran detalladas en el Anexo II.

### 3.8.2.4 Diagnóstico de infecciones intramamarias y análisis estadístico

El diagnóstico de IIM y curas bacteriológicas se determinó de la siguiente manera (Figura 7):

- \* Se consideró IIM de un cuarto cuando se aisló un organismo patógeno de una de las muestras tomadas en cada periodo.
- \* Se definió como cuartos curados al pos parto a aquellos que mostraron IIM al secado y ausencia de infección al pos parto.
- \* Se definieron nuevas IIM al pos parto a aquellos cuartos libres de IIM al secado y con IIM al pos parto.

A su vez se analizó el efecto de los diferentes tratamientos sobre cada especie bacteriana, y sobre las categorías; patógenos mayores/menores, ambientales y contagiosos.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el Software InfoStat (versión 2011). Se utilizó un modelo lineal generalizado (*general lineal model*-

GLM) mixto (efectos fijos y aleatorios) con función de enlace logística binaria. Se tomaron como efectos fijos el tratamiento y el número de lactancia de todos los animales. El rodeo y las vacas dentro de los rodeos se consideraron como aleatorios. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

	PRE SECADO	POS PARTO
Cuarto curado al pos parto	Presencia de IIM	Ausencia de IIM
Nuevas IIM al pos parto	Ausencia de IIM	Presencia de IIM

FIGURA 7. Representación gráfica del diagnóstico de IIM y curas bacteriológicas.

### 3.8.3.5 Recolección de datos de producción de leche individual y recuento de células somáticas durante la lactancia siguiente al tratamiento

Con la finalidad de evaluar el efecto de los tratamientos aplicados sobre la producción de leche y el RCS en la lactancia siguiente, del total de vacas en producción que fueron incluidas en las pruebas de campo ( $n=102$ ), 97 vacas fueron consideradas para evaluar estos parámetros ya que cinco vacas fueron excluidas por que no lograron finalizar la lactancia durante el período de muestreo (10 meses consecutivos). De estas 97 vacas, 45 habían sido tratadas con cefalexina y 52 tratadas con PG + cefalexina.

Los datos individuales de cada animal (considerando todos sus cuartos) fueron extraídos de la base de datos electrónica provista por la asociación civil que agrupa a entidades de la región habilitadas para prestar el servicio de control lechero denominada Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero (A.L.E.Co.L.).

Los valores de litros de leche producidos y el RCS fueron expresados como el promedio de los datos individuales de cada animal para cada tratamiento en relación a los meses de lactancia posteriores al tratamiento.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un diseño en bloque de medidas repetidas. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 4. RESULTADOS



## 4.1 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

### 4.1.1 Efecto sobre la viabilidad de MAC-T

Los resultados de los ensayos de viabilidad con la prueba de reducción del cloruro de tetrazolio, mostraron que todas las concentraciones de PG evaluadas (0,5, 1, y 3 mg/ml), comparadas con el grupo control (sin PG=0 mg/ml) no afectaron la viabilidad de MAC-T en los distintos tiempos de observación (2 hs  $p=0,996$ , 8 hs  $p=0,914$ , 24 hs  $p=0,959$ ) (Figura 8).

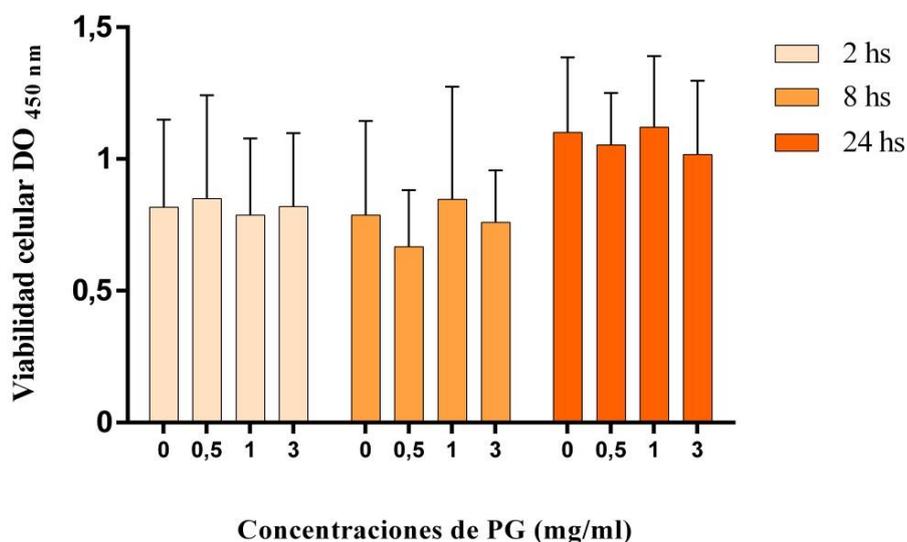
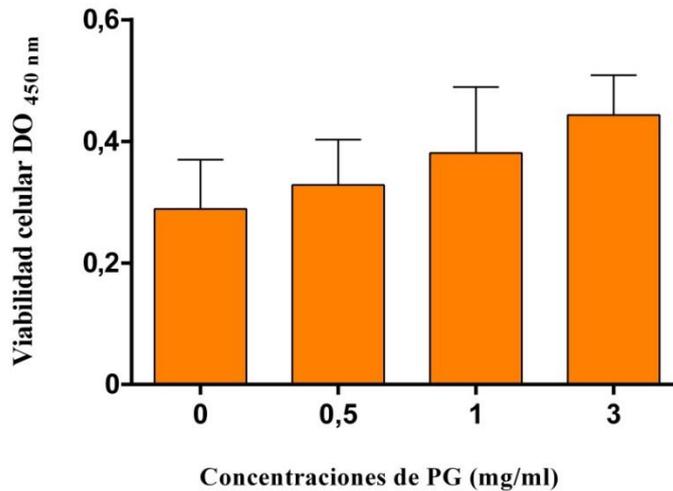


FIGURA 8. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de PG sobre la viabilidad de MAC-T durante 2, 8 y 24 horas. Cada columna representa el promedio de triplicados  $\pm$  desvío estándar de tres ensayos independientes.

### 4.1.2 Efecto sobre la viabilidad de macrófagos

El efecto de PG sobre la viabilidad de macrófagos fue determinado luego de 24 hs de contacto, y los resultados mostraron que todas las concentraciones de PG evaluadas (0,5, 1, y 3 mg/ml) y comparadas con el grupo control (sin PG=0 mg/ml) no afectaron la viabilidad de los mismos ( $p=0,106$ ) (Figura 9).



**FIGURA 9.** Efecto del tratamiento durante 24 hs con diferentes concentraciones de PG sobre la viabilidad de macrófagos. Cada columna representa el promedio de triplicados  $\pm$  desvío estándar de tres ensayos independientes.

## 4.2 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA EN MAC-T Y MACRÓFAGOS

### 4.2.1 Confirmación de tamaño de productos de qRT-PCR

Para confirmar que el producto de qRT-PCR correspondía a cada uno de los genes bovinos estudiados, se realizó un gel de agarosa al 2%, en el cual se sembraron dichos productos junto a un marcador de tamaño de pares de bases. Las bandas obtenidas de los productos amplificados para cada gen evaluado se correspondieron con el tamaño de fragmento esperado.

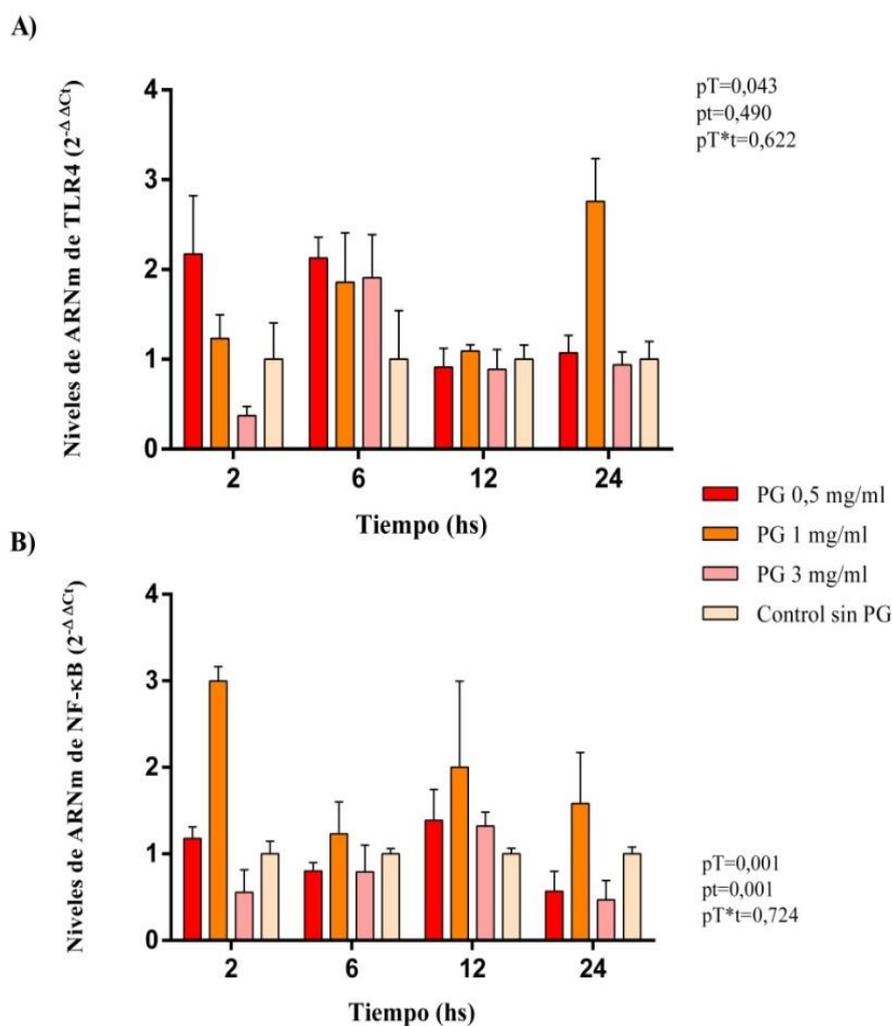
### 4.2.2 Niveles de expresión génica de TLR4 y NF- $\kappa$ B en MAC-T

Se evaluó la expresión génica de TLR4 y NF- $\kappa$ B en MAC-T cultivadas con diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml), durante 2, 6, 12 y 24 hs.

Con respecto a los niveles de transcripción de TLR4 se observó que fueron influenciados por el tratamiento con PG ( $p=0,043$ ), no observándose efecto del

tiempo de muestreo ( $p=0,490$ ) ni de la interacción entre ambos factores ( $p=0,622$ ). A las 24 hs los niveles de ARNm de TLR4 alcanzaron su máxima expresión con el tratamiento de 1 mg/ml de PG (Figura 10.A).

Con respecto a los niveles de transcripción de NF- $\kappa$ B, se observó que los mismos fueron influenciados por el tratamiento ( $p=0,001$ ) y el tiempo de muestreo ( $p=0,001$ ), pero no por la interacción entre ambos factores ( $p=0,724$ ). Los mayores valores de expresión génica para NF- $\kappa$ B se detectaron en las MAC-T tratadas con PG 1 mg/ml en todas las horas evaluadas (Figura 10.B).

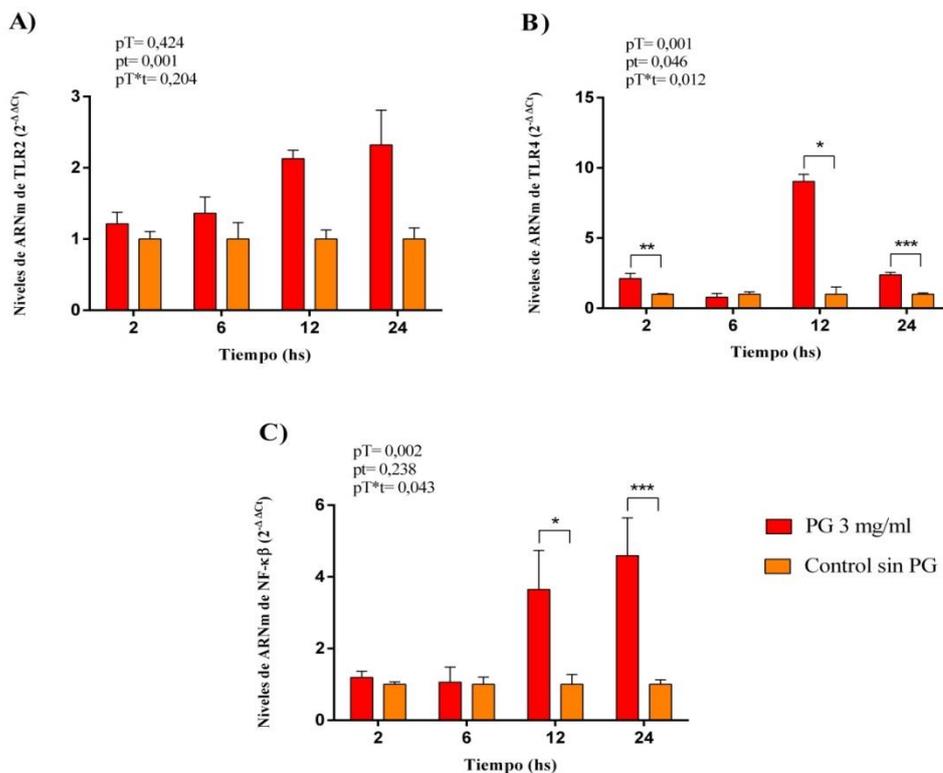


**FIGURA 10.** Expresión génica relativa de TLR4 (A) y NF- $\kappa$ B (B) en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG durante 2, 6, 12 y 24 hs. Los valores se representan como  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  error estándar de la media (EEM). Cada columna representa el promedio de triplicados de tres experimentos independientes. Se muestra el efecto de tratamiento (T), tiempo de muestreo (t) y la interacción de tratamiento \* tiempo (T\*t).

### 4.2.3 Niveles de expresión génica de TLR2, TLR4 y NF-κB en macrófagos

Se evaluó la expresión génica de TLR2, TLR4 y NF-κB en macrófagos cultivados con PG (3 mg/ml), durante 2, 6, 12 y 24 hs.

Con respecto a los niveles de transcripción de TLR2, se observó que los mismos no fueron influenciados por el tratamiento ( $p=0,424$ ), pero sí por el tiempo de muestreo ( $p=0,001$ ). La interacción entre el tratamiento y el tiempo de muestreo no fue significativa ( $p=0,204$ ). Si bien los valores de expresión génica de TLR2 fueron mayores en el grupo tratado con PG (3 mg/ml) hasta las 24 hs pt, no se observaron diferencias con el grupo control (Figura 11.A).



**FIGURA 11.** Expresión génica relativa de TLR2 (A), TLR4 (B) y NF-κB (C) en macrófagos tratados con PG durante 2, 6, 12 y 24 hs. Los valores se representan como  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  EEM. Cada columna representa el promedio de triplicados de tres experimentos independientes. Se muestra el efecto del tratamiento (T), tiempo de muestreo (t) y la interacción de tratamiento\*tiempo (T\*t). Los asteriscos sobre las columnas indican diferencias significativas para cada tiempo de muestreo (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Con respecto a los niveles de transcripción de TLR4, se observó que los mismos se vieron influenciados por el tratamiento ( $p=0,001$ ), el tiempo de muestreo ( $p=0,046$ ) y su interacción ( $p=0,012$ ); detectándose a las 2 hs ( $p<0,01$ ), 12 hs ( $p<0,05$ ) y 24 hs ( $p<0,001$ ) los mayores niveles de expresión génica en macrófagos tratados con PG con respecto al grupo control (Figura 11.B).

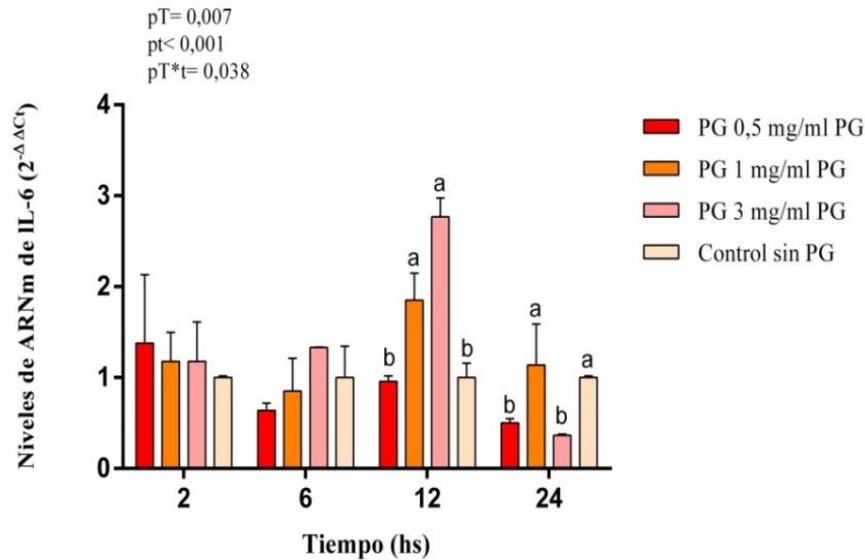
Con respecto a los niveles de transcripción de NF- $\kappa$ B, se observó que los mismos se vieron influenciados por el tratamiento ( $p=0,002$ ) y por la interacción entre ambos factores ( $p=0,043$ ). A las 12 ( $p<0,05$ ) y 24 hs ( $p<0,001$ ) se observaron los mayores niveles de expresión génica de NF- $\kappa$ B en macrófagos tratados con PG con respecto al grupo control (Figura 11.C).

#### **4.2.4 Niveles de expresión génica de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en MAC-T**

Se evaluó la expresión génica de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en MAC-T cultivadas con diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml), durante 2, 6, 12 y 24 hs.

En la figura 12 se muestran los niveles de expresión génica relativa de IL-6 en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG y a diferentes tiempos. Los niveles de transcripción se vieron influenciados por el tratamiento ( $p=0,007$ ), el tiempo de muestreo ( $p<0,001$ ) y por la interacción entre ambos factores ( $p=0,038$ ). A las 12 hs pt los niveles de transcripción de IL-6 en MAC-T tratadas con 1 y 3 mg/ml de PG fueron mayores que los niveles observados en MAC-T tratadas con 0,5 mg/ml de PG y el grupo control ( $p<0,05$ ). A las 24 hs la expresión de ARNm para IL-6 fue mayor en células tratadas con 1 mg/ml de PG comparado con las tratadas con 0,5 y 3 mg/ml ( $p<0,05$ ) pero sin diferir con el grupo control.

Para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fue posible realizar la cuantificación de los niveles de expresión génica ya que el 75% de las muestras no entraron en el rango dinámico de trabajo.



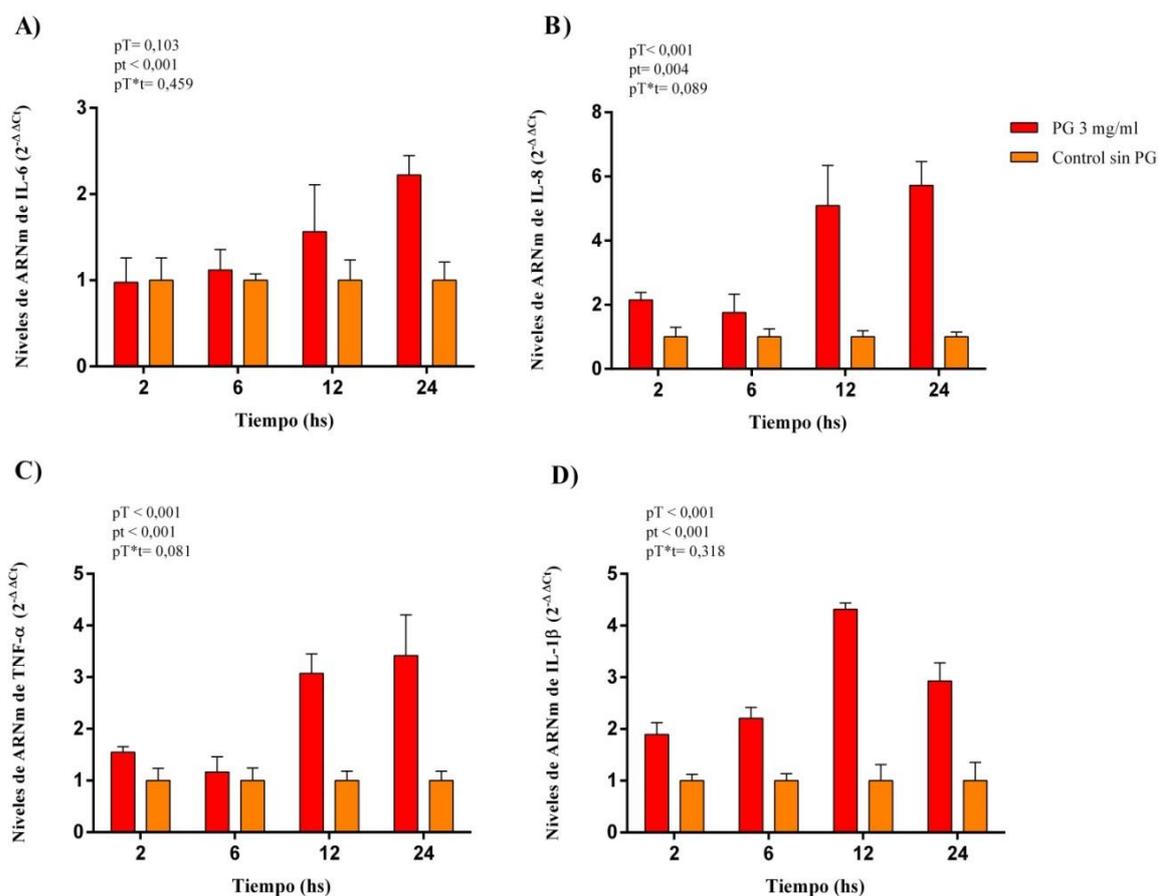
**FIGURA 12.** Expresión génica relativa de IL-6 en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG a las 2, 6, 12 y 24 hs pt. Los valores se representan como  $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm EEM$ . Cada columna representa el promedio de triplicados de tres experimentos independientes. Se muestra el efecto del tratamiento (T), tiempo de muestreo (t) y la interacción de tratamiento\*tiempo (T\*t). Diferentes letras indican diferencias significativas para cada tiempo de muestreo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5 Niveles de expresión génica de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en macrófagos

Se evaluó la expresión de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en macrófagos cultivados con PG (3 mg/ml), durante 2, 6, 12 y 24 hs.

En la figura 13 se muestra el efecto del tratamiento con PG (3 mg/ml) sobre la expresión génica de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en macrófagos durante diferentes tiempos de exposición (2, 6, 12 y 24 hs).

Los niveles de transcripción para IL-6 si bien se vieron influenciados por el tiempo de exposición al PG ( $p < 0,001$ ), no se observó efecto del tratamiento ( $p = 0,103$ ) ni de la interacción entre ambos factores ( $p = 0,459$ ). Los mayores niveles de expresión génica de IL-6 en macrófagos tratados con PG se observaron a las 12 y 24 hs pt (Figura 13.A).



**FIGURA 13.** Expresión génica relativa de IL-6 (A), IL-8 (B), TNF-α (C) e IL-1β (D) en macrófagos tratados con PG a las 2, 6, 12 y 24 hs pt. Los valores se representan como 2<sup>-ΔΔCt</sup> ± EEM. Cada columna representa el promedio de triplicados de tres experimentos independientes. Se muestra el efecto del tratamiento (T), tiempo de muestreo (t) y la interacción de tratamiento\*tiempo (T\*t).

Los niveles de transcripción para IL-8 se vieron influenciados por el tratamiento ( $p < 0,001$ ) y el tiempo de exposición ( $p = 0,004$ ), no observándose interacción entre ambos factores ( $p = 0,089$ ). Los mayores niveles de expresión génica para IL-8 en macrófagos tratados con PG se observaron a las 12 y 24 hs pt (Figura 13.B).

Los niveles de transcripción para TNF-α se vieron influenciados por el tratamiento ( $p < 0,001$ ) y el tiempo de exposición ( $p < 0,001$ ), no observándose interacción entre ambos factores ( $p = 0,081$ ). Los mayores niveles de expresión génica para TNF-α en macrófagos tratados con PG se observaron a las 12 y 24 hs pt (Figura 13.C).

Los niveles de transcripción para IL-1 $\beta$  se vieron influenciados por el tratamiento ( $p < 0,001$ ) y el tiempo de exposición ( $p < 0,001$ ), no observándose interacción entre ambos factores ( $p = 0,318$ ). Los mayores niveles de expresión génica para IL-1 $\beta$  en macrófagos tratados con PG se observaron a las 12 y 24 hs pt (Figura 13.D).

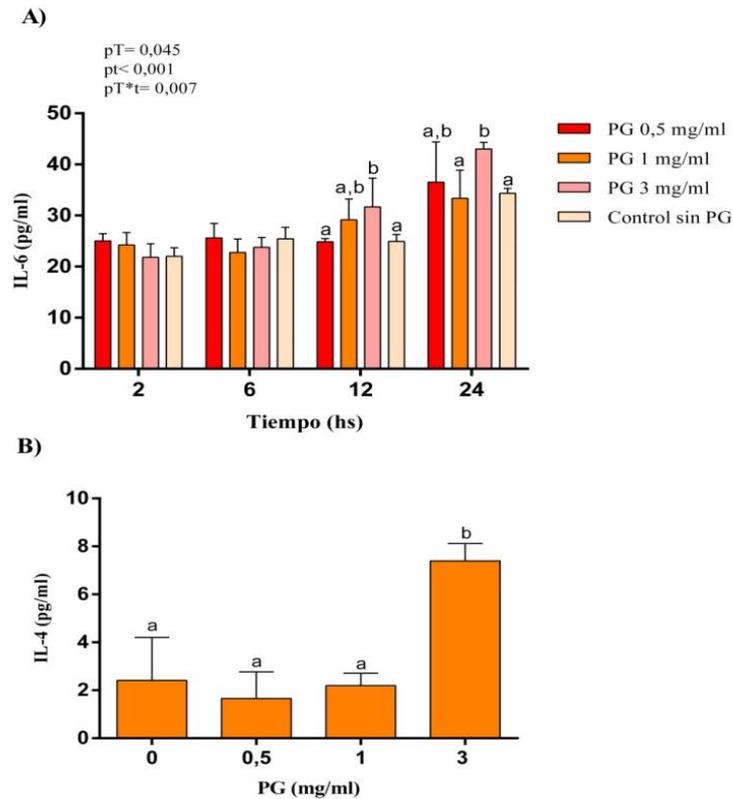
#### 4.2.6 Niveles proteicos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4 en MAC-T

Se evaluaron mediante ELISA los niveles proteicos de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4 en MAC-T tratadas con PG (0,5, 1, y 3 mg/ml) durante 2, 6, 12 y 24 hs.

Los niveles proteicos de IL-1 $\beta$  estuvieron por debajo del límite de prueba detectable en todos los grupos evaluados y en todos los tiempos de muestreo.

Los niveles proteicos de IL-6 se vieron influenciados por el tratamiento ( $p = 0,045$ ), el tiempo ( $p < 0,001$ ) y la interacción entre ambos factores ( $p = 0,007$ ). A las 12 hs los niveles proteicos de IL-6 fueron mayores en las células tratadas con 3 mg/ml de PG comparados a los tratados con 0,5 mg/ml de PG y el grupo control. A las 24 hs los niveles proteicos de IL-6 fueron mayores en las células tratadas con 3 mg/ml con respecto a las tratadas con 1 mg/ml de PG y al grupo control (Figura 14.A).

Con respecto a la producción de IL-4 por parte de las MAC-T, solo se pudo cuantificar esta citoquina a las 24 hs, ya que a las 2, 6 y 12 hs los valores obtenidos se encontraron por debajo del límite inferior de la curva estándar para todos los grupos evaluados. Los niveles de IL-4 fueron mayores en las células tratadas con 3 mg/ml de PG en comparación con los niveles observados en los demás tratamientos y el grupo control ( $p < 0,01$ ) (Figura 14.B).



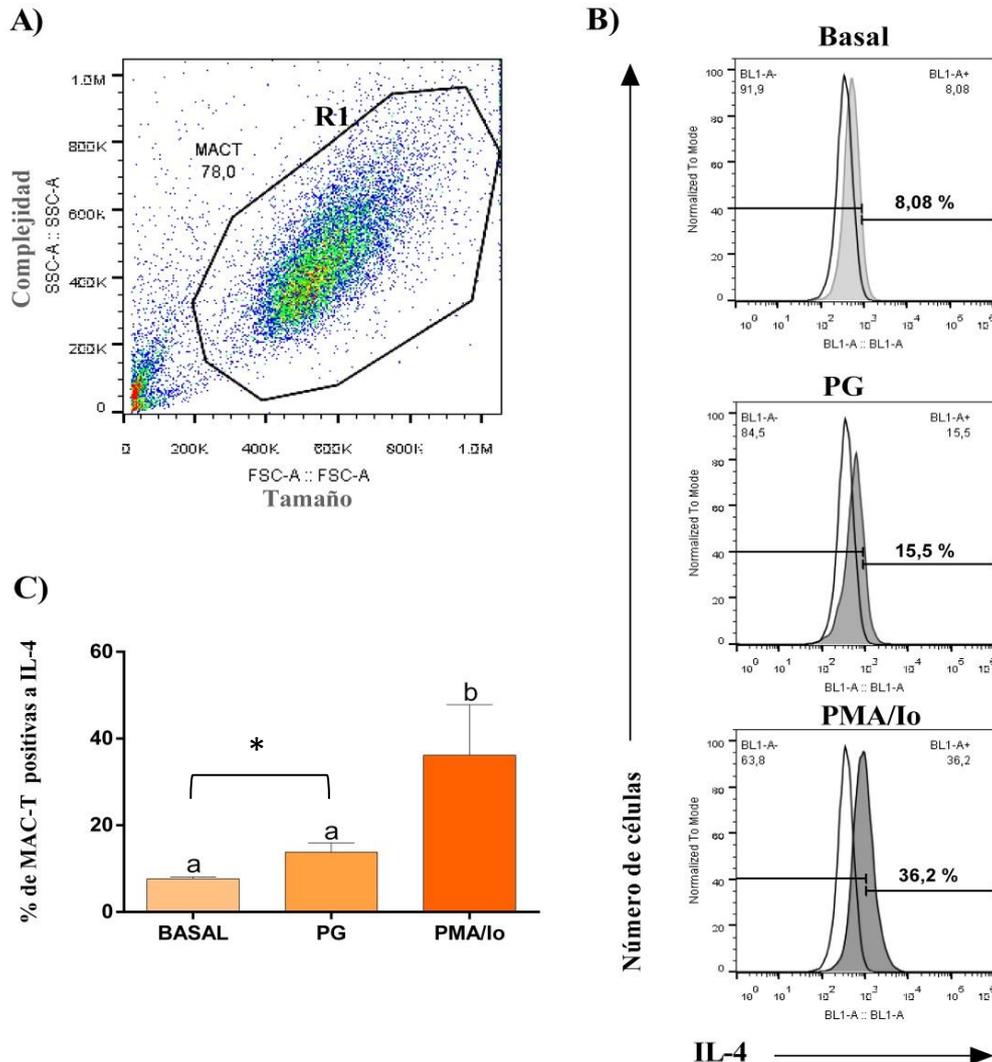
**FIGURA 14.** Niveles proteicos (pg/ml) de IL-6 (A) e IL-4 (B) en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG durante 2, 6, 12, y 24 hs para IL-6, y durante 24 hs para IL-4. Cada columna representa el promedio de duplicados  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

#### 4.2.6.1 Producción intracelular de IL-4 en MAC-T

La producción intracelular de IL-4 en MAC-T tratadas con PG (3 mg/ml) durante 24 hs fue evaluada mediante citometría de flujo.

Los resultados demostraron que las MAC-T producen intracelularmente IL-4 (detectada por la marcación del anticuerpo anti-IL-4-FITC en la región R1) y que esta puede ser secretada al medio. Por otro lado, si bien la producción de IL-4 fue significativamente inducida en MAC-T tratadas con PMA e ionomicina (control positivo), el tratamiento con 3 mg/ml de PG no indujo cambios significativos en la producción intracelular de esta citoquina comparado con las células del grupo control (basal) ( $p<0,05$ ) (Figura 15). Sin embargo al comparar

el grupo basal y PG se observó un incremento significativo en la producción de IL-4 en el grupo tratado con PG ( $p=0,03$ ).

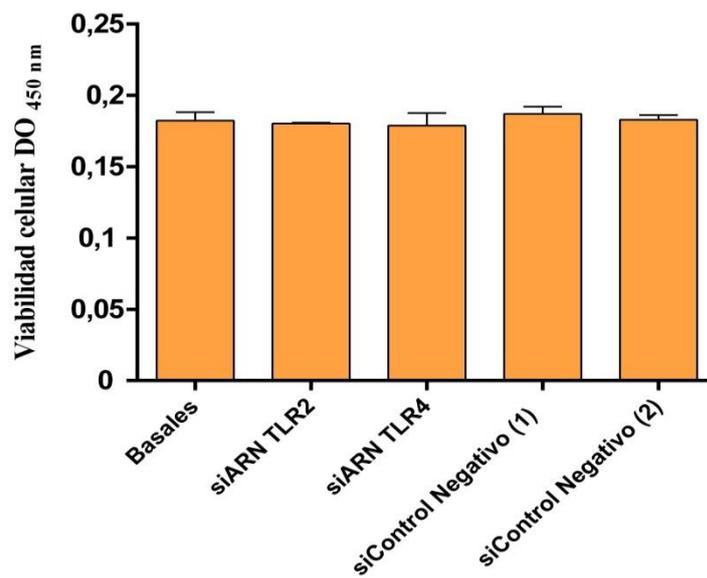


**FIGURA 15.** Producción intracelular de IL-4 en MAC-T. A) Diagrama representativo de tamaño versus complejidad citoplasmática que muestra la región 1 (R1) para un análisis adicional de IL-4 en la población de MAC-T. B) Histograma representativo que muestra las células teñidas con control de isotipo (vacío) o IL-4 mAb (relleno, gris) para células sin tratar (control-basal), tratadas con 3 mg/ml de PG por 24 hs y tratadas con PMA-ionomicina (control positivo) por 6 hs. C) Porcentaje de MAC-T positivas para IL-4 en los grupos evaluados. Los datos se expresan como promedio de triplicados  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes. Las letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p<0.05$ ). (\*) El asterisco indica diferencias significativas ( $p=0,03$ ) entre el grupo basal y PG, (*t* student).

### 4.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE TLR2 Y TLR4

#### 4.3.1 Efecto de siARNs sobre la viabilidad celular

Los resultados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba de reducción del cloruro de tetrazolio demostraron que los siARNs evaluados no afectaron la viabilidad de los macrófagos hasta las 48 hs en cultivo ( $p=0,477$ ) (Figura 16).



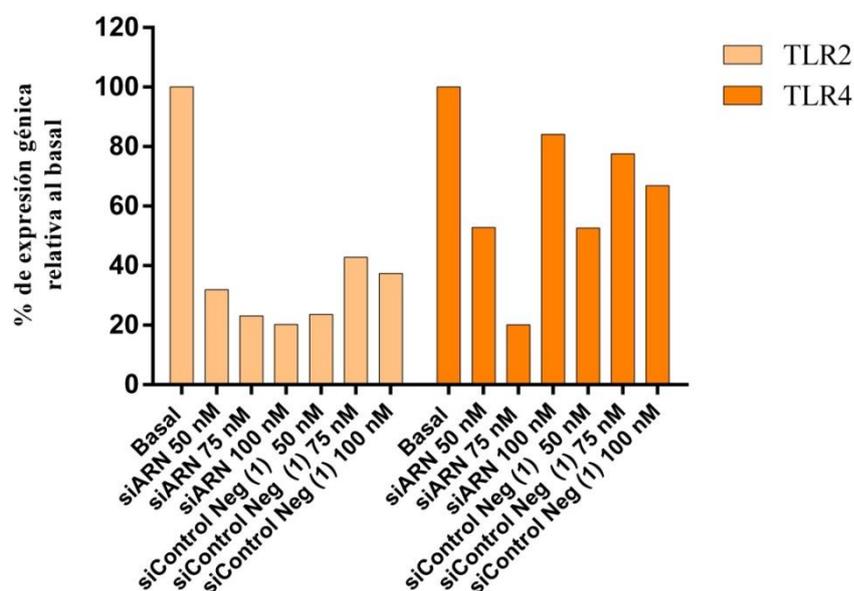
**FIGURA 16.** Efecto del tratamiento con 75 nM de siARN TLR2, siARN TLR4, siControl negativo (1), siControl negativo (2) sobre la viabilidad de macrófagos durante 48 horas. Cada columna representa el promedio de triplicados  $\pm$  desvío estándar de tres ensayos independientes.

#### 4.3.2 Determinación de la concentración de siARN

Con respecto al silenciamiento de TLR2 (evaluado mediante expresión génica) se observó que las concentraciones de siARN de 50, 75 y 100 nM, silenciaron al gen que codifica para TLR2 en un 75% aproximadamente, ya que los valores de expresión génica fueron de 31,9%, 23% y 20,2% respectivamente comparado con el de las células controles (basales) en las cuales la expresión

génica fue del 100%. Por otra parte, se observó que para todas las concentraciones evaluadas del siControl negativo (1), el silenciamiento fue cercano al 60% (Figura 17), ya que los valores de expresión génica rondaron el 40%. Estos resultados no se relacionan con los porcentajes de silenciamiento esperados para un siControl negativo, los cuales deberían ser similares a los obtenidos en las células controles (basales).

Con respecto al silenciamiento del TLR4, se observó que la concentración de siARN de 75 nM fue la que logró silenciar al gen en cuestión en un 80%, ya que los valores de expresión génica se redujeron hasta en un 20,1% comparado a los pocillos controles (basales) con un 100% de expresión génica. Con respecto a las concentraciones de 50 y 100 nM, los porcentajes de expresión génica fueron mayores a los obtenidos con la concentración de 75 nM, mostrando valores superiores al 50%. Por otro lado, se observó que la concentración de 75 nM del siControl negativo (1), produjo un silenciamiento aproximado del 20%, ya que los valores de expresión génica rondaron el 80%. (Figura 17).



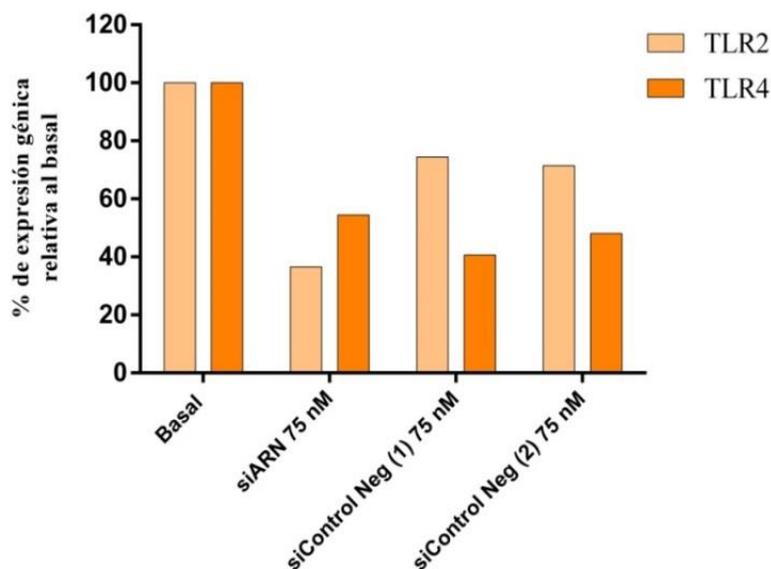
**FIGURA 17.** Porcentajes de expresión génica de TLR2 y TLR4 relativa al control (basal) en macrófagos tratados con diferentes concentraciones de siARN y siControl negativo (1) durante 48 hs.

Considerando los resultados obtenidos, se realizaron nuevos ensayos con un segundo siControl negativo comercial utilizando la concentración de 75 nM para los siARN TLR2 y TLR4.

### 4.3.3 Evaluación del siControl negativo adecuado y el tiempo de silenciamiento

Este ensayo se realizó para evaluar y comparar el desempeño de los siControl negativo (1 y 2) (Tabla 2) y estimar el tiempo de silenciamiento adecuado.

Con respecto al silenciamiento de TLR2 y TLR4 durante 24 hs se observó que la concentración de 75 nM logró silenciar a ambos genes en un 63,5% y en un 45,6% respectivamente, ya que los valores de expresión génica obtenidos fueron del 36,5% para TLR2 y del 54,4% para TLR4, en comparación con el de las células controles (basales) en los cuales la expresión génica fue del 100% (Figura 18).



**FIGURA 18.** Porcentajes de expresión génica de TLR2 y TLR4 relativa al control (basal) en macrófagos tratados con 75 nM de siARN y siControl negativo (1 y 2) durante 24 hs.

Con respecto a la evaluación de los siControl negativo (1 y 2), se observó que para TLR2 los porcentajes de silenciamiento fueron del 25%

aproximadamente (ya que los valores de expresión génica fueron cercanos al 75 %) y de un 60-50% de silenciamiento (40-50% de expresión génica) para TLR4, en comparación con el de las células controles (basales) en las cuales la expresión génica fue del 100% (Figura 18).

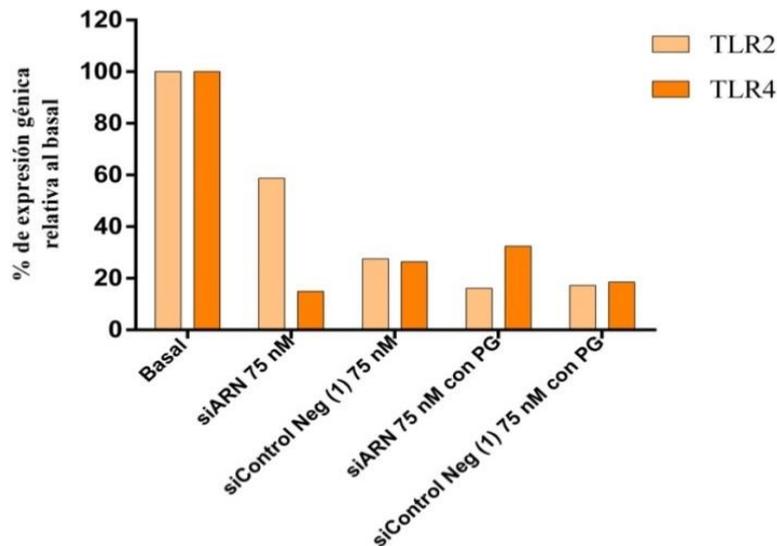
#### 4.3.4 Silenciamiento génico y tratamiento con *Panax ginseng*

En este ensayo se evaluó la concentración de 75 nM de siARN para ambos receptores *toll* y el siControl negativo (1). El silenciamiento de los genes en estudio se realizó durante 24 hs, y luego de ese periodo las células se trataron con 3 mg/ml de PG durante 24 hs. Paralelamente en células que no fueron tratadas con PG se evaluó que los genes (TLR2 y TLR4) se mantuvieran silenciados luego de 24 hs de remover los siARNs.

Los resultados mostraron que para TLR2, en las células que no fueron tratadas con PG, el silenciamiento fue del 41,3% (58,7% de expresión génica); mientras que, en las células tratadas durante 24 hs con PG el silenciamiento fue de un 83,8% (16,2% de expresión génica).

Para TLR4, en las células que no fueron tratadas con PG, se observó un silenciamiento del 85,1% (14,9% de expresión génica); mientras que, en las células tratadas durante 24 hs con PG el silenciamiento fue de un 67,6% (32,4% de expresión génica).

Por otra parte, en las células que no fueron tratadas con PG, los porcentajes de silenciamiento observados para el siControl negativo (1) comparado con los siARN TLR2 y TLR4 fueron del 72,5% y 73,6% (27,5 y 26,4% de expresión génica, respectivamente). Cuando se le adicionó PG al medio, los porcentajes de silenciamiento observados fueron del 82,8% y 81,5% (17,2 y 18,5% de expresión génica, respectivamente) (Figura 19).



**FIGURA 19.** Porcentajes de expresión génica de TLR2 y TLR4 relativa al control (basal) en macrófagos silenciados con siARNs y tratados con 3 mg/ml de PG y sin PG durante 24 hs.

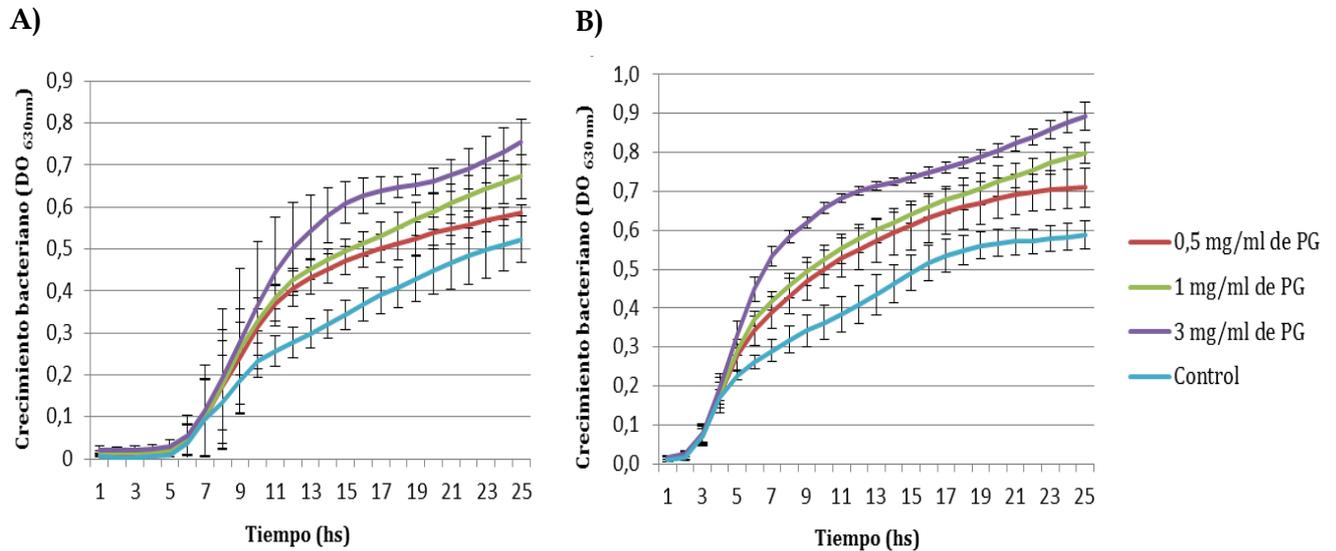
Si bien para este objetivo se logró la puesta a punto del silenciamiento de TLR2 y TLR4, no se obtuvieron resultados apropiados para los controles de la técnica, por lo cual hasta el momento de presentar el manuscrito para su evaluación no fue posible determinar el efecto del silenciamiento en la activación de las células por PG. Se continúa trabajando sobre este objetivo y pensando alternativas para su desarrollo.

#### **4.4 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* IN VITRO**

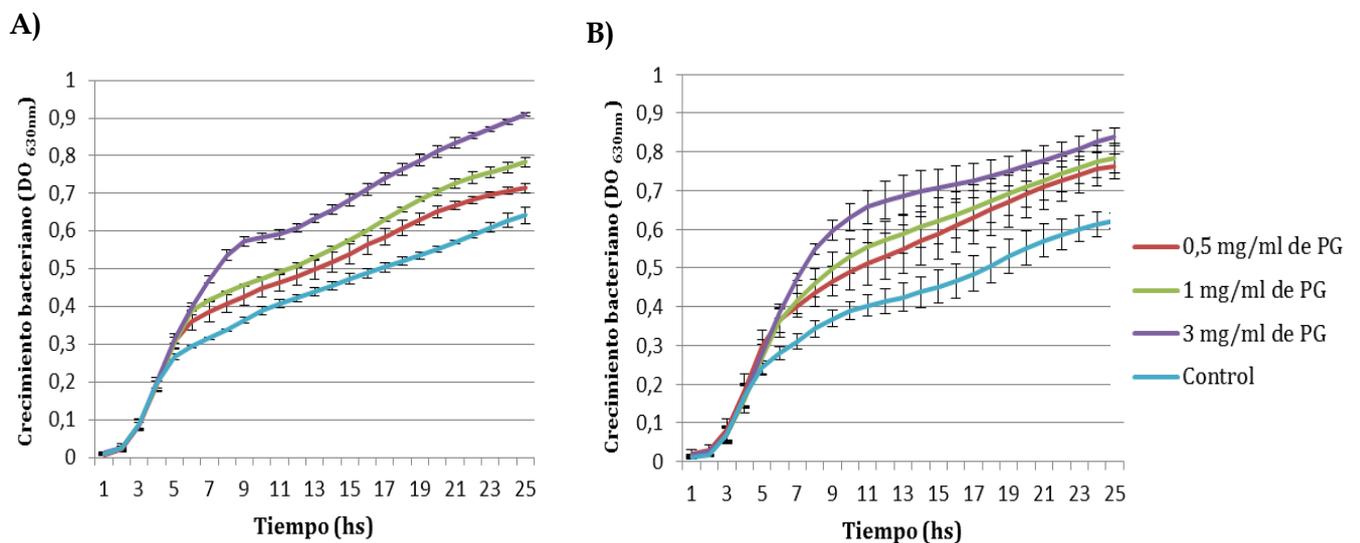
Para analizar si el agregado de diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml) al medio de cultivo modifica el crecimiento bacteriano de dos cepas de *S. aureus* se realizaron curvas de crecimiento bacteriano con caldo M-H pH normal (7,2 - 7,4) (Figura 20) y pH modificado (6,7 similar al de la leche bovina) (Figura 21).

El análisis de las DO obtenidas luego de la incubación por 24 hs de las cepas Newbould 305 (ATCC 29740) y cepa 5011 en ambos caldos, demostró que hubo un efecto significativo del tratamiento con PG ( $p < 0,001$ ) sobre el

crecimiento bacteriano. La adición al medio de PG estimuló el crecimiento de ambas cepas de *S. aureus* observándose un efecto mayor con la concentración de 3 mg/ml ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo control (Figuras 20 y 21).



**FIGURA 20.** Efecto de PG sobre el crecimiento de *S. aureus* cepa Newbould 305 (A) y cepa 5011 (B) en caldo con pH normal (7,2 - 7,4), hasta las 24 hs. Los valores representan el promedio de duplicados  $\pm$  desvío estándar de tres ensayos independientes. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas indicó un efecto significativo del tratamiento con PG para ambas cepas ( $p < 0,001$ ).



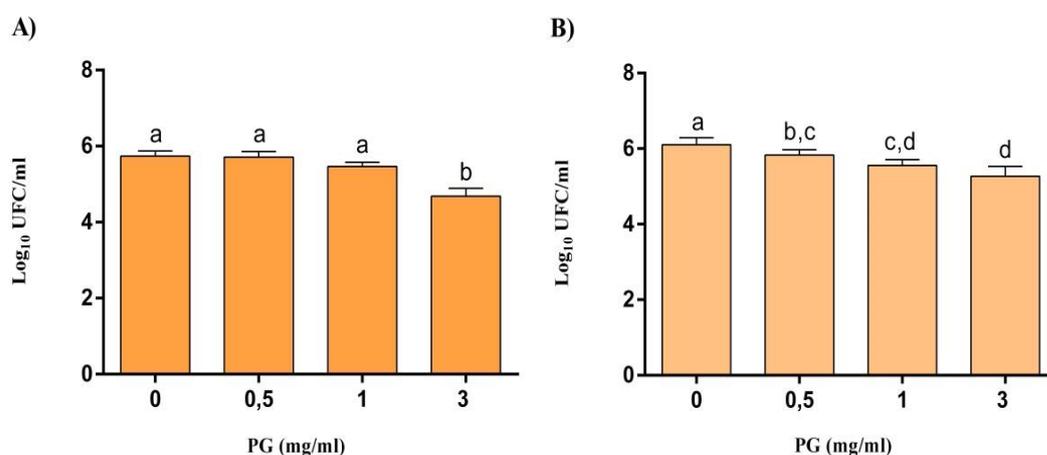
**FIGURA 21.** Efecto de PG sobre el crecimiento de *S. aureus* cepa Newbould 305 (A) y cepa 5011 (B) en caldo con pH modificado (6,7, similar al de la leche bovina), hasta las 24 hs. Los valores representan el promedio de duplicados  $\pm$  desvío estándar de tres ensayos independientes. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas indicó un efecto significativo del tratamiento con PG para ambas cepas ( $p < 0,001$ ).

#### 4.5 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA INTERNALIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* A MAC-T

La capacidad de invasión de *S. aureus* a las MAC-T pre-tratadas con diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml) fue evaluada mediante ensayos de internalización.

En los ensayos con la cepa Newbould 305 de *S. aureus* se observó una disminución significativa de la internalización en las células pre-tratadas con 3 mg/ml de PG en relación a las tratadas con 0,5 mg/ml, 1 mg/ml de PG y al grupo control ( $p < 0,05$ ) (Figura 22.A).

En los ensayos con la cepa 5011 de *S. aureus*, se observó una disminución significativa en la internalización a las MAC-T tratadas con todas las concentraciones de PG (concentración-dependiente), comparadas con el grupo control ( $p < 0,05$ ) (Figura 22.B).



**FIGURA 22.** Efecto de diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml) sobre la internalización de las cepas Newbould (A) y 5011 (B) de *S. aureus* a las MAC-T durante 24 hs. Los gráficos representan el  $\text{log}_{10}$  de UFC/ml recuperadas luego de la lisis de las células. Las columnas muestran el promedio de triplicados  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes. Las columnas con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## **4.6 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS**

### **4.6.1 Selección de la población de macrófagos y análisis de la fagocitosis**

Previo al análisis de fagocitosis, se llevó a cabo la identificación de la población de macrófagos (en uno de los tubos tipo eppendorf destinado a tal fin) mediante la marcación con el anticuerpo anti-CD14 por citometría de flujo. El porcentaje promedio de células CD14 positivas en la región de los macrófagos fue de 38% (33-40,7%) en todos los aislamientos realizados. En esta región se evaluó el efecto de PG sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de fagocitosis ni en las IFM entre los macrófagos tratados con PG (3 mg/ml) y el grupo control en los co-cultivos con ambas cepas de *S. aureus* evaluadas (Newbould 305 y cepa 5011). En la tabla 3 se muestran los porcentajes de macrófagos con bacterias adheridas e internalizadas (% fagocitosis) y los valores de IFM, que estiman el número de bacterias fagocitadas por célula positiva, para ambas cepas de *S. aureus* y en ambos grupos evaluados (tratamiento con PG y control). Asimismo se detallan las significancias estadísticas para cada grupo evaluado.

### **4.6.2 Activación de macrófagos: producción de especies reactivas de oxígeno**

La producción de ROS por los macrófagos durante el co-cultivo con ambas cepas de *S. aureus* (Newbould 305 y cepa 5011) no fue modificada por el tratamiento con PG (3 mg/ml). No se observaron diferencias en la intensidad de producción de ROS cuando los macrófagos tratados con PG y controles se co-cultivaron con la cepa de *S. aureus* cepa 5011. Sin embargo, cuando los macrófagos se trataron con PG y luego se co-cultivaron con la cepa Newbould 305 de *S. aureus* la intensidad de producción de ROS fue significativamente mayor a la observada en los macrófagos controles. En la tabla 3 se muestra el

porcentaje de macrófagos que produjeron ROS y el valor estimado de la intensidad de ROS producido por cada macrófago positivo (IFM), para ambas cepas de *S. aureus* y para los diferentes tratamientos. Además se detallan las significancias estadísticas para cada grupo evaluado.

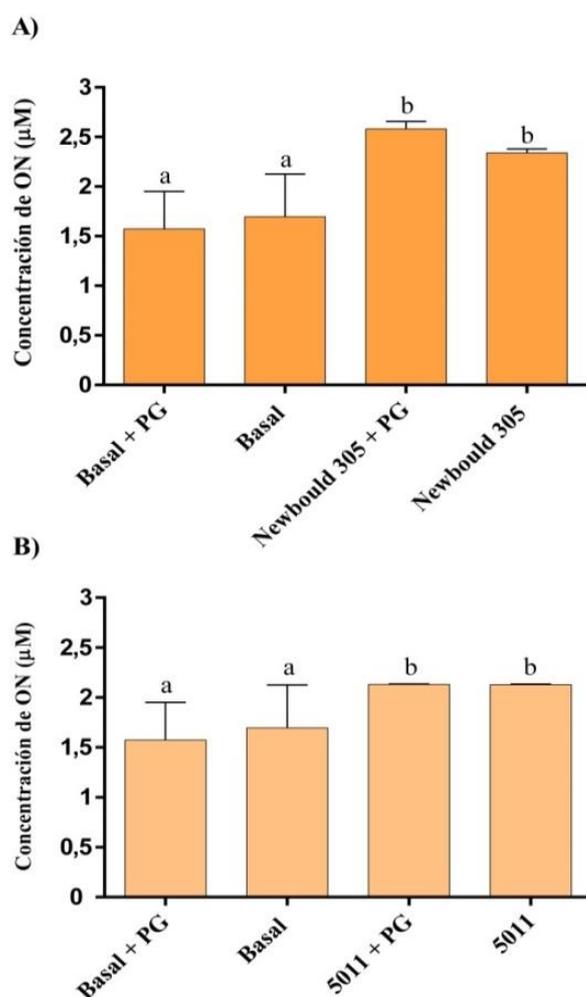
Variable	Tratamiento con PG	Control	P (valor)
% Fagocitosis <i>S. aureus</i> Newbould 305	84,40 ± 2,52 <sup>a</sup>	83,43 ± 2,40 <sup>a</sup>	0,656
IFM <i>S. aureus</i> Newbould 305	112500,33 ± 22432,70 <sup>a</sup>	88834,00 ± 25289,31 <sup>a</sup>	0,985
% Fagocitosis <i>S. aureus</i> 5011	87,97 ± 1,46 <sup>a</sup>	88,90 ± 3,001 <sup>a</sup>	0,654
IFM <i>S. aureus</i> 5011	106092,00 ± 2455,65 <sup>a</sup>	121818 ± 9939,61 <sup>a</sup>	0,056
Producción de ROS <i>S. aureus</i> Newbould 305	12,00 ± 1,21 <sup>a</sup>	16,07 ± 3,01 <sup>a</sup>	0,096
Intensidad de producción de ROS <i>S. aureus</i> Newbould 305	647,00 ± 95,52 <sup>a</sup>	488,33 ± 11,37 <sup>b</sup>	0,046
Producción de ROS <i>S. aureus</i> 5011	11,48 ± 1,42 <sup>a</sup>	11,46 ± 2,85 <sup>a</sup>	0,985
Intensidad de producción de ROS <i>S. aureus</i> 5011	355,00 ± 12,86 <sup>a</sup>	387,33 ± 103,54 <sup>a</sup>	0,722

**TABLA 3.** Efecto de PG (3 mg/ml) sobre la actividad fagocítica y producción de ROS en macrófagos aislados de secreción mamaria. Cada valor representa el promedio de triplicados ± desvío estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05).

#### 4.6.3 Activación de macrófagos: producción de óxido nítrico

Mediante la reacción de Griess se evaluó la producción de ON como parámetro indicador de activación de macrófagos.

Los resultados mostraron que si bien la exposición a ambas cepas de *S. aureus* (Newbould 305 y 5011) aumentó significativamente la producción de ON en comparación con los niveles basales ( $p < 0,05$ ), los mismos no se vieron influenciados por la adición de PG (3 mg/ml) al medio de cultivo (Figura 23).



**FIGURA 23.** Efecto de PG (3 mg/ml) sobre la producción de ON en sobrenadantes de macrófagos co-cultivados con las cepas Newbould 305 (A) y 5011 (B) de *S. aureus*. Los valores basales representan macrófagos sin contacto con las bacterias. Cada columna representa el promedio de triplicados  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes. Las columnas con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## 4.7 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE *Panax ginseng* MEDIANTE PRUEBAS DE CAMPO

### 4.7.1 Evaluación del efecto de *Panax ginseng* sobre la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de la cefalexina

#### 4.7.1.1 Concentración inhibitoria mínima de la cefalexina

Con la finalidad de evaluar la actividad antimicrobiana de la cefalexina combinada con PG frente a *S. aureus* se realizaron ensayos de microdilución en caldo. La CIM de la cefalexina se evaluó utilizando las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 (cepa de referencia) y cepa 17 (aislada de mastitis bovina). Para ambas cepas se evaluaron 3 condiciones diferentes: cefalexina sin PG, cefalexina con PG (0,5 mg/ml) y cefalexina con PG (3 mg/ml). La lectura de los resultados se realizó visualmente y mediante lectura de DO por espectrofotometría.

**Interpretación visual de CIM con la cepa ATCC 29213:** al comparar el crecimiento de la cepa ATCC 29213 con las diferentes concentraciones de cefalexina se determinó que tanto en el caldo sin PG como en el caldo con PG en una concentración de 0,5 mg/ml, los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la concentración de 0,25 µg/ml inclusive, determinando como CIM la concentración inmediata superior de 0,5 µg/ml. En cambio en el caldo con PG en una concentración de 3 mg/ml, los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la concentración de cefalexina de 0,125 µg/ml inclusive, determinando como CIM la concentración inmediata superior de 0,25 µg/ml.

**Interpretación mediante DO de CIM con la cepa ATCC 29213:** en la tabla 4 se observan las DO obtenidas de las lecturas en espectrofotómetro. Los pocillos con DO>1 se correspondieron con los que mostraron botón de crecimiento a simple vista. En los pocillos conteniendo una concentración de cefalexina de 0,25 µg/ml y 0,125 µg/ml (columnas rojas) se observó una disminución en los promedios de DO en los pocillos tratados con 3 mg/ml de

PG en comparación con los tratados con 0,5 mg/ml de PG y control sin PG ( $p < 0,05$ ).

**Interpretación visual de CIM con la cepa 17:** al comparar el crecimiento de la cepa 17 de *S. aureus* con las diferentes concentraciones de cefalexina se determinó que en el caldo sin PG los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la concentración de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inclusive, determinando como CIM la concentración inmediata superior de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . En el caldo con PG en una concentración de 0,5 mg/ml y en el caldo con PG en una concentración de 3 mg/ml, los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la concentración de cefalexina de 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inclusive, determinando como CIM la concentración inmediata superior de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las DO obtenidas de las lecturas en espectrofotómetro coincidieron con las lecturas visuales, aquellos pocillos con  $\text{DO} > 1$  se correspondieron con los que mostraron botón de crecimiento a simple vista.

**Interpretación mediante DO de CIM con la cepa 17:** en la tabla 5 se presentan los promedios de DO obtenidos de las lecturas en espectrofotómetro. En los pocillos conteniendo una concentración de cefalexina de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (columna roja), tratados con 0,5 mg/ml y 3 mg/ml de PG, se observó una disminución en los valores de DO en comparación con los pocillos controles sin tratamiento ( $p < 0,05$ ). En los pocillos conteniendo una concentración de 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cefalexina (columna roja), se observó una disminución en los valores de DO en los pocillos tratados con 3 mg/ml de PG en comparación con los pocillos tratados con 0,5 mg/ml de PG y controles sin PG ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7.1.2 Concentración bactericida mínima de la cefalexina

La CBM de la cefalexina se realizó en conjunto con los ensayos de CIM de la cepa ATCC 29213 de *S. aureus*. Mediante las lecturas de UFC luego del cultivo de 24 hs en agar base se comparó el crecimiento de *S. aureus* con las diferentes concentraciones de cefalexina y se determinó que tanto en el caldo sin PG como en el caldo con PG en una concentración de 0,5 mg/ml hubo

crecimiento bacteriano hasta la concentración de 8 µg/ml inclusive, considerando la CBM a la concentración inmediata superior de 16 µg/ml de cefalexina.

Con respecto a la concentración de 3 mg/ml de PG el crecimiento bacteriano se visualizó hasta la concentración de 4 µg/ml considerando la CBM de la cefalexina la concentración de 8 µg/ml (Tabla 4).

Concentración de cefalexina (µg/ml)	16 a 2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	Control sin ATB	CIM µg/ml	CBM µg/ml
Caldo sin PG	-	0,32 ±0,24	0,28±0,07	1,42±0,41 <sup>a</sup>	1,82±0,11 <sup>a</sup>	1,95±0,09	2,16±0,04	0,5	16
Caldo + PG (0,5 mg/ml)	-	0,31±0,19	0,51±0,08	1,27±0,35 <sup>a</sup>	2,05±0,11 <sup>a</sup>	2,15±0,01	2,30±0,12	0,5	16
Caldo + PG (3 mg/ml)	-	0,48±0,22	0,84±0,05	0,72±0,11 <sup>b</sup>	1,08±0,28 <sup>b</sup>	1,76±0,39	2,42±0,11	0,25	8

**TABLA 4.** Promedio de los valores DO<sub>600nm</sub> ± desvío estándar de los diferentes tratamientos y concentraciones de cefalexina, utilizando la cepa de referencia de *S. aureus* (ATCC 29213). Cada valor representa el promedio de duplicados ± desvío estándar de tres experimentos independientes. En las columnas rojas diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05). CIM: concentración inhibitoria mínima, CBM: concentración bactericida mínima.

Concentración de cefalexina (µg/ml)	16 a 2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	Control sin ATB	CIM µg/ml	CBM µg/ml
Caldo sin PG	-	0,74±0,29	1,58±0,30 <sup>a</sup>	1,71±0,35 <sup>a</sup>	1,91±0,04	1,95±0,04	2,14±0,11	1	-
Caldo + PG (0,5 mg/ml)	-	0,34±0,05	0,37±0,02 <sup>b</sup>	1,66±0,24 <sup>a</sup>	2,01±0,09	2,12±0,02	2,27±0,05	0,5	-
Caldo + PG (3 mg/ml)	-	0,73±0,08	0,97±0,06 <sup>c</sup>	1,14±0,23 <sup>b</sup>	1,82±0,38	2,16±0,17	2,58±0,05	0,5	-

**TABLA 5.** Promedio de los valores DO<sub>600nm</sub> ± desvío estándar de los diferentes tratamientos y concentraciones de cefalexina, utilizando la cepa 17 de *S. aureus*. Cada valor representa el promedio de duplicados ± desvío estándar de tres experimentos independientes. En las columnas rojas diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05). CIM: concentración inhibitoria mínima, CBM: concentración bactericida mínima.

#### 4.7.2 Efecto de *Panax ginseng* sobre infecciones intramamarias de vacas en producción al inicio del periodo de secado

Mediante la realización de pruebas de campo con vacas al final de su lactancia, se evaluó la eficacia de PG como un agente auxiliar de la terapia de vaca seca, administrado en combinación con cefalexina.

Los diagnósticos bacteriológicos se realizaron el último día del ordeño previo a la administración del tratamiento (muestra pre secado), y al pos parto temprano (dentro de las 24 hs posteriores al parto).

##### 4.7.2.1 Datos descriptivos de distribución de cuartos mamarios sanos e infectados al inicio del periodo de secado

En la tabla 6 se muestran los porcentajes de cuartos mamarios sanos e infectados tratados con cefalexina y PG + cefalexina al secado. La distribución de los diferentes tratamientos aplicados a cada cuarto mamario al momento del secado fue homogénea (Chi-cuadrado=0,885).

	Estado Inicial (secado)		
Tratamiento	Cuartos sanos	Cuartos infectados	Total
Cefalexina	156	48	204
	76,50%	23,50%	100%
PG + Cefalexina	173	55	228
	75,90%	24,10%	100%
Total	329	103	432

TABLA 6. Porcentajes de cuartos mamarios sanos e infectados tratados con cefalexina y PG + cefalexina al secado.

En la tabla 7 se presentan los porcentajes de los diferentes microorganismos aislados a partir de cuartos mamarios infectados al momento

del secado previo al tratamiento con cefalexina y PG + cefalexina. Los patógenos más prevalentes aislados antes del tratamiento recibido, fueron *S. aureus* y SCN. En un tercer orden se ubicaron los *Streptococcus no agalactiae* (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus spp*).

<b>Estado bacteriológico inicial (secado)</b>			
<b>Microorganismos</b>	<b>Cefalexina</b>	<b>PG + Cefalexina</b>	<b>Total</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	19	35
	7,80%	8,30%	8,10%
<i>Streptococcus no agalactiae</i>	13	9	22
	6,40%	3,90%	5,10%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0
	0	0	0
<i>Staphylococcus coagulasa negativo (SCN)</i>	14	22	36
	6,90%	9,60%	8,30%
<i>Corynebacterium bovis</i>	2	2	4
	1%	0,90%	0,90%
<i>Escherichia coli</i>	2	1	3
	1%	0,40%	0,70%
<b>Otros</b>	2	3	5
	1%	1,30%	1,20%

**TABLA 7.** Porcentajes de los diferentes microorganismos aislados a partir de cuartos mamarios infectados al momento del secado previo al tratamiento con cefalexina y PG + cefalexina.

#### 4.7.2.2 Datos descriptivos de distribución de cuartos mamarios sanos e infectados al pos parto

En la tabla 8 se presentan los porcentajes de cuartos mamarios sanos e infectados tratados con cefalexina y PG + cefalexina al pos parto. La distribución de los diferentes tratamientos aplicados a cada cuarto mamario al momento del pos parto fue homogénea (Chi-cuadrado=0,399).

Tratamiento	Estado final (pos parto)		Total
	Cuartos sanos	Cuartos infectados	
Cefalexina	156	48	204
	76,50%	23,50%	100%
PG + Cefalexina	182	46	228
	79,80%	20,20%	100%
<b>Total</b>	338	94	432

**TABLA 8.** Porcentajes de cuartos mamarios sanos e infectados tratados con cefalexina y PG + cefalexina al pos parto.

En la tabla 9 se presentan los porcentajes de los diferentes microorganismos aislados a partir de cuartos mamarios infectados al pos parto luego del tratamiento de ambos grupos. De la tabla 9 se desprende que los patógenos más prevalentes aislados al pos parto temprano luego del tratamiento recibido, fueron *S. aureus* y SCN. Los *Streptococcus no agalactiae* (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus spp*) se presentaron en un tercer orden pero con una baja prevalencia (1,60%).

Estado bacteriológico al pos parto (final)			
Microorganismos	Cefalexina	PG+Cefalexina	Total
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	20	37
	8,30%	8,80%	8,60%
<i>Streptococcus no agalactiae</i>	4	3	7
	2,00%	1,30%	1,60%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0	2
	1%	0	0,50%
<i>Staphylococcus coagulasa negativo (SCN)</i>	21	12	33
	10,30%	5,30%	7,60%
<i>Corynebacterium bovis</i>	2	0	2
	1%	0,00%	0,50%
<i>Escherichia coli</i>	4	2	6
	2%	0,90%	1,40%
<b>Otros</b>	1	9	10
	1%	3,90%	2,30%

**TABLA 9.** Porcentajes de los diferentes microorganismos aislados a partir de cuartos mamarios infectados al pos parto luego del tratamiento con cefalexina y PG + cefalexina.

#### 4.7.2.3 Efecto de *Panax ginseng* sobre las infecciones intramamarias

Analizando el **total de cuartos mamarios sanos e infectados** tratados al momento del secado (n=432), se observó que en aquellos cuartos que recibieron cefalexina, la prevalencia de IIM al pos parto temprano fue de 26,9%. Por otra lado, en los cuartos tratados con PG + cefalexina, la prevalencia de IIM al pos parto fue de 23,3%. Si bien con este último tratamiento la prevalencia fue menor, el efecto no fue significativo (p=0,507).

No se observó un efecto del número de lactancias sobre la prevalencia de IIM al pos parto ( $p=0,153$ ).

Analizando el **total de cuartos mamarios sanos** al momento del secado ( $n=329$ ) no se observaron diferencias entre ambos tratamientos en la prevención de nuevas IIM al pos parto temprano ( $p=0,43$ ), ya que el porcentaje de nuevos casos fue similar para ambos tratamientos (16% para los tratados con cefalexina y 12,6% para los tratados con PG + cefalexina).

No se observó un efecto del número de lactancias sobre la tasa de nuevas IIM al pos parto ( $p=0,90$ ).

Analizando el **total de cuartos mamarios infectados** al momento del secado ( $n=103$ ), se observó que en los tratados con cefalexina la tasa de cura fue del 36,1%. Por otra parte, en los tratados con PG + cefalexina la tasa de cura fue similar (36,4%), no observándose diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,979$ ).

La tasa de cura para cuartos mamarios infectados al secado fue del 77,2% en animales de hasta 2 lactancias y de 47,7% en animales de más de 2 lactancias, observándose un efecto significativo del número de lactancias sobre el porcentaje de cura de los cuartos infectados ( $p=0,016$ ).

#### **4.7.2.4 Efecto de *Panax ginseng* sobre las infecciones intramamarias por *Staphylococcus aureus***

Los **cuartos mamarios sanos** que fueron tratados al secado con cefalexina, mostraron al pos parto temprano una tasa de nuevas IIM por *S. aureus* del 6,1%. En cambio, los cuartos tratados al secado con PG + cefalexina mostraron una tasa de nuevas IIM por *S. aureus* del 3,9%. Si bien la tasa de nuevas IIM con el tratamiento de PG + cefalexina fue menor, esta diferencia no fue significativa ( $p=0,313$ ).

El número de lactancias no tuvo efecto sobre la tasa de nuevos casos para *S. aureus* ( $p=0,80$ ).

Analizando el **total de cuartos mamarios que presentaban IIM por *S. aureus*** al momento del secado (n=35), en aquellos tratados con cefalexina se observó una tasa de cura del 85,8%. En cambio en los que fueron tratados con PG + cefalexina la tasa de cura fue menor (28,2%), observándose diferencias significativas entre los tratamientos (p=0,003).

La tasa de cura para *S. aureus* fue del 89,1% en animales de hasta 2 lactancias y de 22,7% en animales de más de 2 lactancias, observándose un efecto significativo del número de lactancias sobre el porcentaje de cura de los animales infectados con *S. aureus* (p=0,001).

#### **4.7.2.5 Efecto de *Panax ginseng* sobre las infecciones intramamarias por *Staphylococcus coagulasa* negativos**

Los **cuartos mamarios sanos** tratados al secado con cefalexina, tuvieron una tasa de nuevas IIM por SCN al pos parto temprano de 7,3%. En cambio, los cuartos tratados al secado con PG + cefalexina tuvieron una tasa de nuevas IIM por SCN al pos parto temprano de 4,3%. Si bien la tasa de nuevas IIM con el tratamiento de PG + cefalexina fue menor, esta diferencia no fue significativa (p=0,267).

El número de lactancias no tuvo efecto sobre la tasa de nuevos casos para SCN (p=0,59).

Analizando el **total de cuartos mamarios que presentaban IIM por SCN** al momento del secado (n=36), en aquellos tratados con cefalexina se observó una tasa de cura del 69,8%. Por otra parte, en los que fueron tratados con PG + cefalexina la tasa de cura fue del 95,8 %. Si bien la tasa de cura para los tratados con PG + cefalexina fue mayor, el efecto no fue significativo (p=0,130), observándose una tendencia.

No se detectó un efecto del número de lactancias sobre la tasa de cura para los animales que al secado presentaban infecciones por SCN (p=0,83), observándose una tasa de cura al pos parto del 86,2% en animales de hasta 2 lactancias y de 89,4% en animales de más de 2 lactancias.

#### 4.7.2.6 Efecto de *Panax ginseng* sobre las infecciones intramamarias por patógenos ambientales

Se incluyen como patógenos ambientales a *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus spp*, *E. coli*, *Enterobacterias* y *SCN*.

Los **cuartos mamarios sanos** tratados al secado con cefalexina, mostraron al pos parto una tasa de nuevos casos por patógenos ambientales del 12%. Los cuartos mamarios sanos tratados al secado con PG + cefalexina, mostraron al pos parto una tasa de nuevos casos por patógenos ambientales del 9,5%. Si bien la proporción de nuevos casos con el tratamiento PG + cefalexina fue menor, no se observaron diferencias significativas con respecto al tratamiento con cefalexina ( $p=0,517$ ).

El número de lactancias no tuvo efecto sobre la tasa de nuevos casos para patógenos ambientales ( $p=0,710$ ).

Analizando el **total de cuartos mamarios que presentaban IIM por patógenos ambientales** al momento del secado ( $n=67$ ), se observó un 78,5% de cura para los tratados con cefalexina, mientras que para los tratados con PG + cefalexina la tasa de cura fue del 87,5 %. Si bien los tratados con PG + cefalexina tuvieron una tasa de cura mayor, la diferencia no fue significativa ( $p=0,449$ ).

No se observó un efecto del número de lactancias sobre la tasa de cura para los animales que al secado presentaban infecciones por patógenos ambientales ( $p=0,899$ ).

#### 4.7.2.7 Efecto de *Panax ginseng* sobre las infecciones intramamarias por patógenos contagiosos

Se incluye como patógenos contagiosos a *S. aureus*, *S. agalactiae*; *Corynebacterium bovis*, y *Staphylococcus coagulasa positivos*.

Los **cuartos mamarios sanos** tratados al secado con cefalexina, mostraron al pos parto una tasa de nuevos casos por patógenos contagiosos del 7,5%. Los

cuartos mamarios sanos tratados al secado con PG + cefalexina, mostraron al pos parto una tasa de nuevos casos por patógenos contagiosos del 3,8%. Si bien la proporción de nuevos casos con el tratamiento de PG + cefalexina fue menor, no se observaron diferencias significativas con respecto al tratamiento con cefalexina ( $p=0,285$ ).

Por otra parte, no se observó efecto del número de lactancias sobre los porcentajes de nuevos casos por patógenos contagiosos ( $p=0,399$ ).

Analizando el **total de cuartos mamarios que presentaban IIM por patógenos contagiosos** al momento del secado ( $n=36$ ), se observó un 55,6% de cura para los tratados con cefalexina, mientras que para los tratados con PG + cefalexina la tasa de cura fue del 27,8%. Los tratados con cefalexina tuvieron una tasa de cura mayor a los tratados con PG + cefalexina ( $p=0,042$ ).

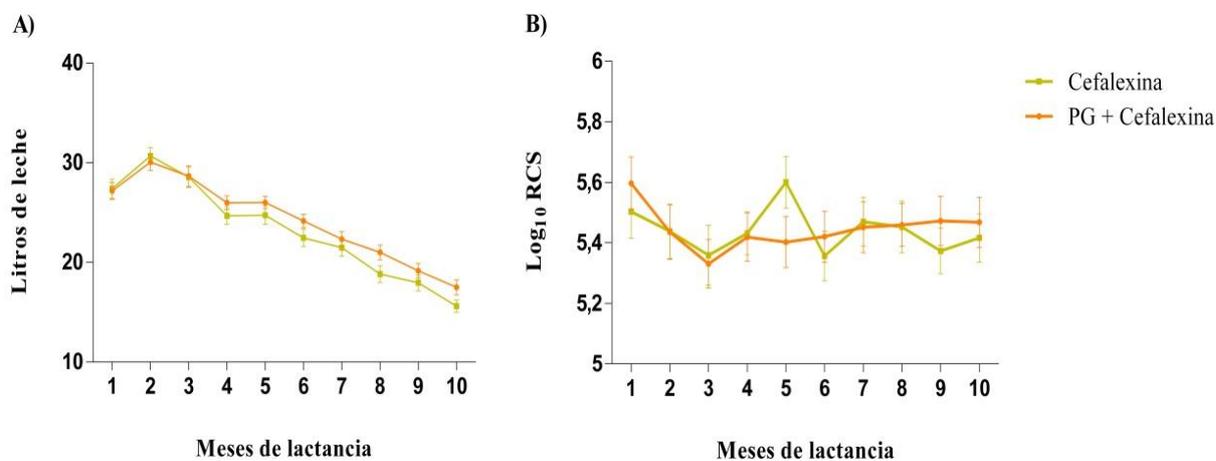
La tasa de cura para patógenos contagiosos fue del 80% en animales de hasta 2 lactancias y de 35,5% en animales de más de 2 lactancias, observándose un efecto significativo del número de lactancias sobre el porcentaje de cura de los animales infectados con patógenos contagiosos ( $p=0,038$ ).

#### **4.7.3 Efecto de *Panax ginseng* sobre la producción de leche y el recuento de células somáticas en la lactancia posterior al tratamiento**

En la figura 25.A se muestran los valores promedios de litros de leche producidos por las vacas tratadas al momento del secado con cefalexina y PG + cefalexina durante la lactancia siguiente al tratamiento. Si bien, a partir del cuarto mes de lactancia los litros promedios producidos por las vacas tratadas con PG + cefalexina fueron mayores a los registrados en las vacas tratadas con cefalexina, no se observó un efecto del tratamiento sobre la producción de leche a lo largo de la lactancia ( $p=0,26$ ).

En la figura 25.B se muestran los valores promedios de los RCS de vacas tratadas al momento del secado con cefalexina y PG + cefalexina durante la lactancia siguiente al tratamiento. Si bien, al quinto mes de lactancia se observó un aumento en el RCS en las vacas tratadas con cefalexina en relación a las

tratadas con PG + cefalexina, no se observó un efecto del tratamiento sobre los RCS a lo largo de la lactancia ( $p=0,97$ ).



**FIGURA 24.** Efecto de PG sobre la producción de leche y el RCS en vacas tratadas al secado con cefalexina y PG + cefalexina durante la lactancia siguiente al tratamiento. A) Promedios de litros de leche producidos por vacas tratadas con cefalexina y PG + cefalexina en relación a los meses de lactancia (medias  $\pm$  SEM). B) Promedio de RCS (Log<sub>10</sub>) para cada tratamiento en relación a los meses de lactancia (medias  $\pm$  SEM).

## 5. DISCUSIÓN



## 5.1 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE MAC-T Y MACRÓFAGOS

Las saponinas, también denominadas ginsenósidos, son el principal componente activo del extracto de raíz de PG (Wang y col., 1979). Estos compuestos son considerados detergentes naturales por sus propiedades surfactantes. En este trabajo, mediante un kit comercial de reducción del cloruro de tretazolio (XTT) se evaluó el posible efecto citotóxico del extracto de PG sobre MAC-T y macrófagos. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml); en el caso de MAC-T durante 2, 8 y 24 hs y en macrófagos durante 24 hs.

Los resultados de estos ensayos demostraron que ninguna de las concentraciones de PG utilizadas *in vitro* con la línea celular MAC-T y macrófagos aislados de secreción mamaria, fue tóxica para las células hasta las 24 hs posteriores al tratamiento. Estos resultados concuerdan con estudios *in vivo* en vacas y ratones desarrollados por Dallard y col. (2011) y Silvestrini y col. (2017), en los cuales luego de la inoculación IM de 3 mg/ml de PG en vacas y de 3, 10 y 50 mg/ml de PG en ratones, se observó ausencia de cambios estructurales y funcionales en la GM y conservación de la integridad del tejido parenquimatoso y estromal.

## 5.2 MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE MAC-T Y MACRÓFAGOS POR *Panax ginseng*

Las CEM y los macrófagos son las primeras células en enfrentarse a los patógenos cuando estos ingresan a la GM, siendo una importante fuente de citoquinas y quimioquinas que atraen neutrófilos en los procesos tempranos de la infección (Thompson-Crispi y col., 2014). Estas células expresan PRR sobre su superficie o dentro de ellas, tales como los receptores tipo *toll* que reconocen ciertas estructuras moleculares bacterianas, denominadas PAMP (Yang y col.,

2008). Tras la unión del ligando, los TLRs inician la transducción de señales que culminan en la activación de MAPK, NF- $\kappa$ B y en la inducción de citoquinas pro-inflamatorias (Lee y Hwang, 2006). Además de componentes microbianos, los TLRs también reconocen moléculas no patogénicas como derivados de plantas y proteínas relacionadas al stress (Asea y col., 2002).

Los compuestos inmunoestimulantes actúan directamente sobre el sistema inmune aumentando la respuesta de forma inespecífica. Entre ellos podemos mencionar a los ligandos de los TLR, toxinas bacterianas, citoquinas, saponinas y polisacáridos (Reed y col., 2009; Cordeiro y col., 2015).

La hipótesis general de este trabajo postula que los ginsenósidos u otros componentes de la raíz de PG inoculados por vía IM al momento de la interrupción de la lactancia, estimulan la respuesta inmune innata por parte del hospedador mediante su reconocimiento por receptores tipo *toll*, generando activación celular y posterior secreción de citoquinas. Por lo tanto, el primer objetivo de este trabajo se centró en evaluar el efecto de PG sobre la expresión de receptores tipo *toll*, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y diferentes citoquinas en MAC-T y macrófagos.

### **5.2.1 Efecto de *Panax ginseng* sobre los niveles de expresión génica de receptores tipo *toll* y NF- $\kappa$ B en MAC-T y macrófagos**

En estudios previos de Baravalle y col. (2015), en cuartos mamarios tratados con PG al momento de la interrupción de la lactancia en bovinos, se observó intensa inmunomarcación para TLR2 y TLR4 en el epitelio secretor de la GM, así como en monocitos-macrófagos, linfocitos y neutrófilos. Además, los porcentajes de inmunomarcación y la expresión de ARNm para ambos receptores, para la proteína adaptadora MyD88 y para el factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B, se vieron significativamente aumentados en los tejidos provenientes de cuartos tratados con PG en comparación con los controles. Estos resultados, llevaron a sugerir que ambos receptores podrían estar

involucrados en la inducción de la respuesta inmune innata desencadenada en la GM bovina luego de la inoculación IM.

Considerando los resultados previos, en el presente estudio, para determinar si el efecto de PG se asocia con la activación de TLR4 y NF- $\kappa$ B en MAC-T, se analizó la expresión génica de ambas moléculas. Para ello, diferentes concentraciones de PG (0,5, 1, y 3 mg/ml) se mantuvieron en contacto con MAC-T durante 2, 6, 12 y 24 hs. Los resultados demostraron que si bien la expresión de TLR4 fue mayor en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG con respecto a los controles, no se observó un efecto del tiempo de muestro ni de la interacción entre ambos factores. Con respecto a NF- $\kappa$ B, si bien la expresión génica fue significativamente mayor en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG con respecto a los controles y se observó un efecto a lo largo del tiempo, no hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo de muestreo. Estos resultados sugieren que TLR4 no sería el principal receptor involucrado en el reconocimiento de PG por MAC-T o podría actuar indirectamente en asociación con otros receptores que no fueron objeto de estudio, tal como los receptores Nalp3 y otros componentes del inflammasoma tal como postulan Wilson y col. (2011) y Morelli y col. (2012).

Si bien existen en la bibliografía antecedentes que demuestran que las MAC-T expresan TLR2 (Ibeagha-Awemu y col., 2008), en el presente estudio no ha sido posible cuantificar los niveles de ARNm para este receptor por PCR en tiempo real. Cabe aclarar que se realizaron numerosos intentos de amplificación utilizando diferentes cebadores propuestos en la bibliografía y diseñados en nuestro laboratorio. En este punto se requieren futuros ensayos para completar los objetivos iniciales propuestos.

Por otra parte, en macrófagos, se evaluaron los niveles de expresión génica de TLR2, TLR4 y NF- $\kappa$ B luego de la estimulación con PG (3 mg/ml) durante 2, 6, 12 y 24 hs. En el caso de TLR2, el efecto del tratamiento con PG sobre los niveles de expresión génica no fue significativo, observándose a las 24 hs los mayores niveles de expresión en relación al grupo control. Estos resultados coinciden con los de Panacci y col. (2006), en los cuales la administración oral de

PG (G115) en ratones sometidos a estrés y en controles sin estresar, no indujo cambios en los niveles de expresión génica para TLR2 en los macrófagos peritoneales.

En contraste a lo observado para TLR2, la expresión génica de TLR4, sí se vio significativamente influenciada por el tratamiento con PG, observándose a las 2, 12 y 24 hs los mayores niveles de expresión en relación a los controles. Si bien los niveles de expresión de TLR4 aumentaron en el tiempo luego del tratamiento, no se observó una asociación en todos los tiempos estudiados. En este sentido, a las 6 hs del tratamiento los niveles de expresión de TLR4 fueron similares en los macrófagos tratados con PG y controles. Este efecto podría relacionarse con una saturación del receptor a las 2 hs del tratamiento con el inmunomodulador, lo cual llevaría a la no inducción de cambios en los niveles de ARNm para TLR4 a las 6 hs pt. Por otra parte, a las 12 hs pt se observó un pico en la expresión génica para TLR4 en comparación con los controles, lo cual podría atribuirse a la fagocitosis del compuesto por parte de los macrófagos y posterior estimulación de la expresión génica del receptor. Esta evidencia podría sustentarse considerando los resultados obtenidos por Su y col. (2015) quienes observaron la localización de Rg1 y Re en el citoplasma de macrófagos murinos y activación de la señalización intracelular por parte de TLR4 hasta las 6 hs pt con estos compuestos. Estos resultados también se relacionan con los obtenidos para TLR2 y NF- $\kappa$ B, donde las mayores expresiones génicas se detectaron a las 12 y 24 hs de contacto de las células con el inmunomodulador.

En relación a NF- $\kappa$ B, la expresión génica se vio significativamente influenciada por el tratamiento, observándose además una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo de muestreo. Como se describió previamente, los mayores niveles de expresión génica en los macrófagos tratados con PG en relación a los del grupo control se detectaron a las 12 y 24 hs. En un estudio previo, Baravalle y col. (2015), en GM bovina tratada con PG al momento de la interrupción de la lactancia observaron la activación de NF- $\kappa$ B en tejido mamario, confirmado por un incremento en la inmunolocalización de la subunidad NF- $\kappa$ B-p65 en los núcleos de las células epiteliales y

estromales. Asimismo Silvestrini y col. (2017), observaron un incremento en la expresión proteica de NF- $\kappa$ B-p65 en células del parénquima mamario en un modelo de mastitis en ratones previamente tratados con PG. Los resultados de esta tesis en conjunto con los previamente observados en los estudios *in vivo* en GM bovina (Baravalle y col. 2015) y GM murina (Silvestrini y col. 2017) podrían sugerir que el tratamiento con PG induce una acción inmunoestimulante sobre los macrófagos presentes en las secreciones mamarias mediante la utilización de la vía de TLR4 y NF- $\kappa$ B. Asimismo, estos resultados podrían relacionarse con los observados por Nakaya y col. (2004) en los cuales el tratamiento con extracto de PG estimuló la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por parte de esplenocitos y macrófagos peritoneales provenientes de ratones C3H/HeN, no así en ratones C3H/HeJ deficientes en el gen que codifica para TLR4. En concordancia, Panacci y col. (2006), observaron que la administración oral de PG (G115), indujo un incremento en la expresión de ARNm para TLR4 en comparación con los controles y estimuló la respuesta inmune de forma gradual en macrófagos peritoneales de ratones estresados. Sumado a esto, Su y col. (2012) demostraron que los ginsenósidos Rg1 y Re, ambos componentes de la raíz de PG, inducen su actividad adyuvante mediante la vía de señalización de TLR4 en ratones pre-tratados con anticuerpos anti-TLR4 y que sería la vía de NF- $\kappa$ B la utilizada para estimular la expresión de IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Si bien el mecanismo exacto que subyace a la acción de PG no se conoce, por los resultados obtenidos hasta aquí, se podría inferir que los ginsenósidos u otros componentes del extracto de PG actuarían como agonistas de TLR4 en macrófagos aislados de secreción mamaria.

### **5.2.2 Efecto de *Panax ginseng* sobre los niveles de expresión génica de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ y niveles proteicos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4 en MAC-T**

Estudios previos demostraron que el número de moléculas de TLR4 involucradas en el reconocimiento determina si la respuesta inmune innata se activará (Di Gioia y Zanoni, 2015) y que PG regula la respuesta inmune a través

de la modulación de la secreción de citoquinas (Kang y Min, 2012). En este trabajo se observó un aumento en la expresión de ARNm para TLR4 en MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de PG en la mayoría de los tiempos evaluados, pero esto no fue suficiente para inducir una estimulación en la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en células epiteliales. Estos resultados sugieren que PG no afecta a TLR4 y sus vías de transducción de señales en el modelo de MAC-T; sin embargo, podría estimular otras vías de señalización de TLRs u otros receptores en las CEM que aún no están claramente identificados y que requieren de futuras investigaciones.

La IL-6 es expresada por una gran variedad de células incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos. Su expresión es inducida por bacterias y virus (Biffi y col.; 1996) y tiene propiedades tanto pro como anti-inflamatorias (Bannerman, 2009). En este trabajo demostramos la expresión de ARNm y la secreción de IL-6 por parte de las MAC-T en respuesta al tratamiento con PG. Los niveles más altos de ARNm se observaron a las 12 hs del tratamiento con 1 y 3 mg/ml de PG, seguido de un aumento en la liberación de la proteína a las 12 y 24 hs del tratamiento con la concentración de 3 mg/ml de PG.

La IL-4, al igual que la IL-6, posee propiedades pro y anti-inflamatorias (Bannerman, 2009), y se expresa en diversos tipos de células luego de la cascada inflamatoria inducida por TLR. Curiosamente, en el presente estudio, el aumento significativo observado en la producción de IL-4, en MAC-T tratadas con 3 mg/ml de PG a las 24 hs, fue en paralelo con el aumento en la producción de IL-6. Ambos resultados, los referidos a IL-6 e IL-4 sugieren que PG tiene la capacidad de modular la respuesta inmune, ya sea promoviéndola o suprimiéndola, y que estos efectos podrían depender de la concentración de PG.

Además, en este trabajo se demostró por primera vez que las CEM bovinas tienen la capacidad de producir IL-4 frente a diferentes estímulos. Para ello, se evaluó la producción intracelular de IL-4 en MAC-T expuestas a PG durante 24 hs mediante citometría de flujo. El tratamiento con PG incrementó significativamente la producción intracelular de esta citoquina en comparación

a la producción basal a las 24 hs tal como se evidenció mediante ELISA. La combinación de PMA + ionomicina (control positivo) estimuló significativamente la producción de IL-4 demostrando que las MAC-T sintetizan esta citoquina en respuesta a estímulos inespecíficos.

### **5.2.3 Efecto de *Panax ginseng* sobre los niveles de expresión génica de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en macrófagos**

Reportes previos han demostrado que macrófagos peritoneales murinos tratados con fracciones polisacáridicas del extracto de *Panax ginseng* (ginsan) producen citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IFNs (Shin y col., 2002). Por otra parte, Ahn y col. (2006b), observaron que el tratamiento con extracto de ginsang disminuía la tasa de letalidad en ratones frente a infecciones por *S. aureus*, lo cual fue asociado con la supresión de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 y IFN- $\gamma$ .

Baravalle y col. (2010), evaluaron el efecto del tratamiento IM con PG al momento del secado sobre la expresión génica y proteica de diferentes citoquinas en leche y observaron un aumento significativo en los niveles de ARNm para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en animales tratados con el inmunomodulador luego de las 48 hs de su aplicación y un aumento significativo en la expresión proteica de TNF- $\alpha$  a las 24 y 48 hs del tratamiento. En un estudio posterior, Baravalle y col. (2011), evaluaron el efecto de PG sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y el reclutamiento de monocitos/macrófagos en tejido mamario luego del tratamiento con PG al momento del secado, demostrando que el inmunomodulador fue capaz de aumentar el reclutamiento de monocitos-macrófagos a la GM y aumentar significativamente los porcentajes de inmunomarcación para TNF- $\alpha$  hasta el día 7 pt.

En el presente estudio, en cuanto a la evaluación de los niveles de expresión génica de citoquinas en macrófagos aislados de secreción mamaria, se detectó un efecto significativo del tratamiento con PG y del tiempo de

exposición con respecto a los controles sobre IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , observándose los mayores niveles de expresión a las 12 y 24 hs pt. Los niveles de ARNm para IL-6 si bien se vieron influenciados por el tiempo de exposición al PG, no se detectó efecto del tratamiento, observándose al igual que para las otras citoquinas los mayores niveles de expresión a las 12 y 24 hs pt. Entre las citoquinas más importantes que promueven la inflamación encontramos a la IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Estas citoquinas se comportan como mediadores clave de la respuesta inmune sistémica y local, ya que no sólo regulan la expresión de una amplia batería de genes incluyendo otras citoquinas, enzimas y proteínas de fase aguda, sino también de genes relacionados con la proliferación y la apoptosis. Mientras que la IL-8 es una quimioquina que participa, principalmente, en el reclutamiento de neutrófilos y, en menor medida, de linfocitos T y en la activación de neutrófilos (Bannerman, 2009).

En conjunto, los resultados obtenidos *in vitro* con MAC-T y macrófagos aislados de secreción mamaria sugieren que el extracto de PG estimula la expresión de receptores de la inmunidad innata, principalmente TLR4, así como también de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas y que la fuente principal de estos mediadores inflamatorios estaría dada por los macrófagos presentes en la GM. Por su parte, en respuesta al tratamiento con PG, las células del epitelio mamario serían fuente de otras citoquinas con un perfil anti-inflamatorio, como IL-4 e IL-6, lo que podría contribuir a regular el proceso inflamatorio en la GM.

### **5.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE TLR2 Y TLR4**

Para determinar si TLR2 y/o TLR4 intervienen efectivamente en la activación de macrófagos luego del tratamiento con PG, se propuso realizar ensayos de inhibición de los mismos mediante la técnica de siARN para ambos receptores. Luego de corroborar que los siARNs no provocan citotoxicidad a los

macrófagos, se comenzó con la puesta a punto del sistema de silenciamiento génico.

En primer lugar se determinó la concentración de siARN adecuada para obtener el mayor silenciamiento génico en las células. Para ello, se evaluaron tres concentraciones tanto para siARN TLR2, siARN TLR4 y para sus respectivos siControl negativo (1). En el caso de TLR2 las concentraciones de siARN de 75 nM y 100 nM fueron las que lograron mayores silenciamientos (aproximadamente 75%); en el caso de TLR4 la concentración de 75 nM fue la que logró un 80% de silenciamiento génico. Estos porcentajes se corresponden con valores de referencias citados por otros autores, tales como Dana y col. (2017) donde obtuvieron en el 60% de sus muestras valores de silenciamiento superiores al 50% y solo en el 11-18% de las muestras silenciamientos del 90-95%. Sin embargo, en el caso de TLR2, los controles negativos produjeron silenciamientos cercanos al 60% en las células. Estos resultados no se relacionan con los porcentajes de silenciamiento esperados para un siControl negativo, los cuales deberían ser similares a los obtenidos en las células controles (basales). Por otra parte, para TLR4, el siControl negativo en una concentración de 75 nM logró un silenciamiento del 20%. Si bien es un valor más aceptable para un control de técnica negativo se optó por evaluar el desempeño de otro siControl negativo comercial (2) y se comparó con el siControl negativo (1). Además se utilizó un tiempo de silenciamiento más acotado (24 hs) para lograr obtener un número de macrófagos viables aceptable para la extracción de ARN al final del ensayo (48 hs).

En el ensayo de silenciamiento de TLR2 y TLR4 durante 24 hs se observó que la concentración de 75 nM logró silenciar a ambos genes en un 63,5% y en un 45,6%, respectivamente. Los siControl negativo (1 y 2) se comportaron prácticamente igual, con porcentajes de silenciamiento del 25% en el caso de TLR2 y de un 50-60% en el caso de TLR4. Estos resultados nos llevaron a optar por el siControl negativo (1), el cual fue utilizado en el ensayo siguiente donde las células luego del proceso de silenciamiento fueron tratadas durante 24 hs con PG.

En el mencionado ensayo se obtuvieron porcentajes de silenciamiento en las células sin tratar con PG del 41,3% para TLR2 y del 85,1% para TLR4, y en las células que luego estuvieron en contacto con PG los porcentajes fueron del 83,8% para TLR2 y del 67,6% para TLR4. Por otra parte, los porcentajes de silenciamiento en los controles negativos en todas las condiciones fueron entre 70 y 80%. Estos porcentajes indican que los siControl negativo (1 y 2) estarían interfiriendo en el silenciamiento de ambos receptores.

Debido a estos resultados y con el objetivo de optimizar la técnica, actualmente se están analizando los BLAST correspondientes de los siControl negativo (1 y 2) comparados con los siARNs utilizados para silenciar en este trabajo. Jensen y col. (2014) en un estudio reciente utilizaron el mismo siControl negativo de Lab. Qiagen que se empleó en el presente estudio, difiriendo en que los ensayos se realizaron utilizando macrófagos derivados de monocitos bovinos. Por lo tanto, una de las alternativas a los controles comerciales podría ser el diseño de controles que se ajusten al modelo de macrófagos bovinos extraídos de secreciones mamarias. Considerando los resultados obtenidos, los controles comerciales empleados en el presente estudio podrían no ser adecuados para el tipo de células utilizadas en nuestros ensayos.

Las secuencias génicas de los siARNs TLR2 y TLR4 utilizados en este estudio fue tomada de dos trabajos: por un lado el de Price y Sheldon (2013), donde realizaron el silenciamiento génico en células de la granulosa de folículos antrales de ovarios bovinos en respuesta a PAMPs bacterianos y por el otro, el de Turner y col. (2014), donde realizaron el silenciamiento de TLR2 en células de endometrio bovino.

Considerando todos los ensayos realizados, los resultados obtenidos hasta el momento demostraron que la concentración de 75 nM de siARN TLR2 y TLR4 fue la que logró los porcentajes de silenciamiento más aceptables. Sin embargo, debido a la importancia de incluir controles adecuados en los experimentos de siARN hasta que no se optimicen los mismos no es posible definir la concentración de siARN a utilizar.

#### **5.4 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus***

Previo a los ensayos de internalización se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de PG (0,5, 1 y 3 mg/ml) sobre el crecimiento de dos cepas de *S. aureus* utilizadas en caldo M-H pH normal (7,2 - 7,4) y pH modificado (6,7, similar al de la leche). La adición de PG al medio de cultivo estimuló el crecimiento de ambas cepas de *S. aureus* notándose un efecto significativo con la concentración de 3 mg/ml. Estos resultados indican que en un sistema de cultivo *in vitro*, PG en una alta concentración podría actuar como un nutriente adicional para el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, esto no ocurriría en un sistema *in vivo* donde el crecimiento bacteriano no solo está regulado por la disponibilidad de nutrientes sino también por la respuesta del sistema inmune del hospedador. Esta afirmación se sustenta con los resultados obtenidos por Silvestrini y col. (2017) donde se observó una disminución significativa en el número de bacterias recuperadas de la GM de ratones tratados con PG y desafiados experimentalmente con *S. aureus*.

#### **5.5 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA INTERNALIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* A MAC-T**

Clásicamente, *S. aureus* se ha caracterizado como un patógeno extracelular (Finlay y Cossart, 1997). Sin embargo, un número creciente de estudios ha demostrado la habilidad de *S. aureus* de invadir y sobrevivir dentro de varios tipos celulares del hospedador, incluyendo CEM, neutrófilos y macrófagos (Almeida y col., 1996; Hebert y col., 2000), lo cual contribuye a su persistencia en numerosas enfermedades de animales y seres humanos (Gresham y col., 2000). Estas particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008), tendiendo a producir infecciones crónicas

que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario de vacas en producción.

Las células epiteliales que revisten el canal del pezón, la cisterna de la glándula y los alvéolos mamarios constituyen en conjunto las primeras células que reconocen a los patógenos y participan en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Recientemente, en infecciones experimentales con *S. aureus* en GM bovina se demostró que las células epiteliales, en sus diferentes localizaciones, proporcionan una respuesta inmune activa y temprana contra el patógeno, destacando su importancia en la patogenia de las IIM en bovinos (Whelehan y col., 2011). Otros estudios sugieren que las CEM podrían afectar diferencialmente la respuesta inflamatoria global en función de cómo reconocen y responden a los diferentes PAMP bacterianos (Bougarn y col., 2010; Gilbert y col., 2013).

Como hemos mencionado anteriormente, estudios recientes demostraron que la inoculación IM de PG inhibió parcialmente la multiplicación de *S. aureus* dentro de la GM murina y, por lo tanto, podría jugar un papel protector contra las IIM causadas por este patógeno (Silvestrini y col., 2017). Para determinar si existe una relación entre el papel protector postulado para PG en un modelo de mastitis de ratón y la capacidad de PG para inhibir las interacciones tempranas entre el organismo y las CEM, realizamos ensayos de internalización en MAC-T con dos cepas de *S. aureus*.

La selección de las dos cepas de *S. aureus* se realizó en base a criterios clínicos y de adaptación a la GM bovina. La cepa Newbould 305 es una cepa de referencia aislada en 1958 de una vaca en Orangeville, Ontario, Canadá, en un caso de mastitis clínica (Prasad y Newbould, 1968; Ben Zakour y col., 2008). Esta cepa induce experimentalmente y de forma reproducible mastitis crónicas con síntomas leves (Hensen y col, 2000; Bannerman y col., 2004; Bouchard y col., 2012). En cambio la cepa 5011, es una cepa de campo, aislada de una infección IM subclínica persistente, con alta adaptación a la GM bovina y con alta capacidad para invadir las CEM utilizada en ensayos previos por miembros del grupo (Pereyra y col., 2016).

Los resultados obtenidos con la cepa Newbould 305 mostraron que el tratamiento con PG en una concentración de 3 mg/ml redujo en forma significativa la internalización de la bacteria a las células epiteliales. En relación a la cepa 5011 de *S. aureus*, los resultados mostraron una disminución significativa en la internalización de la bacteria a MAC-T con todas las concentraciones de PG, observándose un efecto concentración dependiente (mayor concentración de PG, menor internalización a la MAC-T). Considerando que PG no tuvo un efecto inhibitorio sobre *S. aureus*, es probable que una interacción directa de PG con MAC-T esté interviniendo en el proceso de internalización bacteriana. Como bien se sabe, la internalización de *S. aureus* por fagocitos no profesionales implica una interacción entre la proteína de unión a Fn y la célula hospedadora, lo que induce la transducción de señales, promueve la actividad de quinasas y el reordenamiento del citoesqueleto (Dziewanowska y col., 2000). En relación a esto, Xie y col. (2009) reportaron que el ginsenósido Rg1 de *Panax notoginseng* disminuyó los niveles de proteína de colágeno I y Fn de una manera dosis dependiente en células epiteliales tubulares renales de rata. Sobre la base de estas observaciones, se podría teorizar que pueden producirse interacciones moleculares entre las proteínas de superficie de MAC-T y PG, y esto podría evitar la adhesión correcta y la posterior internalización de *S. aureus* a las CEM.

En concordancia con lo observado en este estudio, trabajos recientes han demostrado que los ácidos grasos de cadena corta (propiónico y hexanoico), colecalciferol (vitamina D), farrerol, timol y geniposida inhibieron la internalización de *S. aureus* en CEM bovinas (Alva-Murillo y col., 2012; Tellez-Perez y col., 2012; Yang y col., 2013; Wei y col., 2014b; Wei y col., 2018). Considerando la bibliografía disponible, este es el primer informe que demuestra que PG inhibe la internalización de *S. aureus* en MAC-T. Sin embargo, el mecanismo por el cual PG logra disminuir el ingreso de la bacteria a la célula eucariota sigue sin estar claro. En este sentido, se ha demostrado que una vez que *S. aureus* ingresa al citoplasma, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B estaría vinculado con la señalización intracelular (Oviedo-Boyso y col., 2008) y

la internalización de *S. aureus* en las células epiteliales podría reducirse al inhibir su activación (Wei y col., 2018). En el presente estudio se evaluó la expresión génica de NF-κB promovida por PG en MAC-T y se observó que la concentración de 1 mg/ml indujo niveles de expresión génica mayores al control en todos los tiempos evaluados, y curiosamente la concentración de 3 mg/ml (concentración utilizada en los ensayos de internalización) redujo la expresión génica de NF-κB a las 2, 6 y 24 hs pt en comparación al control. Si bien esta disminución no fue significativa, más estudios deberían realizarse para dilucidar si es por esta vía que PG ejerce su efecto inhibitorio de la internalización.

Considerando la importancia de este resultado, la inhibición de la internalización de *S. aureus* inducida por PG podría reducir el riesgo de invasión al tejido, la diseminación de la infección y la persistencia del patógeno en la GM. En asociación con el efecto inmunoestimulante descrito previamente, la inducción de una respuesta inflamatoria óptima, podría mejorar la eliminación del patógeno en GM bovina.

## **5.6 EFECTO DE *Panax ginseng* SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS**

Los macrófagos cuando se activan por diversos estímulos, aumentan su actividad fagocítica, producen citoquinas y mediadores inflamatorios como el ON y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Guzik y col., 2003). La fagocitosis es un importante proceso que les permite a los macrófagos engullir activamente los microorganismos, formando vesículas que se fusionan con los lisosomas, provocándoles la muerte mediante la lisis de los mismos (Abbas y col., 2012).

En estudios previos se ha reportado que el extracto de ginseng potencia la actividad fagocítica de los macrófagos. En este sentido, Shin y col. (2002) demostraron que macrófagos peritoneales murinos tratados con polisacáridos ácidos de ginseng rojo (RGAPs, ginsan) estimularon la fagocitosis de zymosan, una preparación de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, el

tratamiento de los macrófagos murinos con una combinación de RGAPs e IFN- $\gamma$  ha demostrado una potenciación en la activación de los macrófagos y una mejora sustancial en la producción de ON (Choi y col., 2008). En el presente estudio, el porcentaje de fagocitosis y la IFM de las células que fagocitaron bacterias en el grupo tratado con 3 mg/ml de PG durante 2 hs no difirieron del grupo control sin tratamiento para las cepas de *S. aureus* Newbould 305 y 5011. Sin embargo, no es posible realizar comparaciones directas entre las investigaciones previas mencionadas y los resultados observados en el presente estudio, debido a las diferencias en la naturaleza química del extracto de PG utilizado, así como en el origen de las células evaluadas. Por otra parte, Sordillo y Babiukd (1991) sugieren que durante la involución activa de la GM, la ingesta indiscriminada de componentes de la leche por los macrófagos hace que estas células sean menos efectivas para la fagocitosis, lo que podría explicar los resultados observados en este estudio. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que los macrófagos expresan receptores para IgG1 e IgG2 (Desiderio y Campbell, 1980) y los obtenidos 10-15 días después del cese del ordeño mostraron una mayor captación de *S. aureus* cuando se incubaron con anticuerpos específicos (Renna y col., 2014).

Denis y col. (2006) compararon la capacidad de macrófagos obtenidos a partir de leche en la lactancia media y de secreción mamaria en la mitad del secado para fagocitar y destruir *S. uberis*, y observaron que los macrófagos provenientes de secreciones de secado mostraron mayor actividad bactericida que los obtenidos de leche, destacando la importancia de los diferentes estadios del ciclo de lactación en la funcionalidad de los macrófagos. Por otra parte, Fox y col. (1988), demostraron un incremento en la fagocitosis de *S. aureus* por parte de macrófagos provenientes de secreciones mamarias de animales no infectados al día 14 de la involución con respecto al día 7. Por lo tanto, si se tienen en cuenta los resultados previos, en el presente estudio, el hecho de que los ensayos se hayan realizado con macrófagos provenientes de secreciones mamarias de 14 días de secado no estaría ejerciendo influencia sobre la capacidad fagocítica de las células tratadas con PG.

Las defensas del hospedador y otros procesos fisiológicos tales como la regulación de la apoptosis y la homeostasis inmune están regulados por ROS de una forma crítica (Serhan y Savill, 2005; Quinn y col., 2006). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el tratamiento con PG no fue capaz de inducir la producción de ROS intracelular por parte de los macrófagos co-cultivados con ambas cepas de *S. aureus* (Newbould 305 y 5011), pero tampoco suprimió su producción. Por otra parte, en los macrófagos tratados con PG y co-cultivados con la cepa Newbould 305, la intensidad de producción de ROS por cada macrófago positivo (IFM) fue mayor a la observada en los macrófagos controles. Park y col. (2013) observaron efectos supresores en la producción de ROS en macrófagos RAW264.7 co-cultivados con extractos fermentados y no fermentados de raíz de ginseng silvestre y estimulados con LPS. Asimismo, Choi y col. (2014), utilizando una mezcla de tres plantas medicinales *Angelica gigas* Nakai, *Panax ginseng* y *Rhus verniciflua* Stokes RVS, observaron efectos supresores en la producción de ROS intracelular en células RAW 264.7 cuando éstas fueron estimuladas durante 12 hs con LPS. Las diferencias encontradas entre los resultados de nuestro estudio y aquellos obtenidos por Choi y col. (2014) podrían deberse al tiempo de muestreo evaluado en el presente trabajo (sólo 2 hs de tratamiento con PG).

En contraste a lo observado en el presente estudio, Jiao y col. (2012) investigaron el efecto de oligosacáridos de las raíz de *Panax ginseng* en la activación de macrófagos peritoneales murinos y observaron un incremento en la producción de ROS en concordancia con la producción de ON y TNF- $\alpha$  luego de 24 hs de estimulación. Considerando los resultados de estos autores y los observados en nuestro estudio el tiempo de exposición con el inmunomodulador podría ser un factor importante a tener en cuenta para lograr la activación de los macrófagos.

En el presente estudio, se detectaron diferencias significativas en los niveles de ON en macrófagos infectados con ambas cepas de *S. aureus* (Newbould 305 y 5011) comparados con pocillos controles (sin bacterias); sin embargo, este aumento no se vio afectado por el tratamiento con PG.

Resultados similares fueron obtenidos por Pinello y col. (2006), donde demostraron que *Pfaffia paniculata* (*Brazilian ginseng*) administrada por gavage durante 10 días a ratones pudo potenciar la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales pero no encontraron diferencias en la producción de ON y peróxido de hidrógeno. En contraste, otro estudio ha demostrado que la producción de ON aumentó en macrófagos de ratones tratados con un polisacárido ácido de *Panax ginseng* C. A. Meyer (Park y col., 2001). Las discrepancias entre los estudios mencionados y los observados en este trabajo podrían estar relacionadas con la naturaleza del extracto de PG utilizado, los tiempos de exposición evaluados y el tipo de macrófagos empleados en los ensayos.

Por otro lado, los patrones de señalización intracelular que desencadenan la activación de los macrófagos no están claros, y varían de un compuesto a otro. Byeon y col. (2012) demostraron que el patrón de activación de macrófagos por LPS fue distinto al patrón utilizado por RGAP (polisacárido ácido de *ginseng rojo*). La producción de ON inducida por RGAP, se asoció con niveles aumentados de iNOS y factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B, AP-1 y CREB. En este trabajo la expresión génica de NF- $\kappa$ B en macrófagos se encontró aumentada luego de la exposición a PG durante 12 y 24 hs, lo que podría sugerir una posible vía de activación de los fagocitos; aunque se requieren mayores estudios que puedan comprobar estos mecanismos.

## **5.7 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE *Panax ginseng* EN VACAS EN PRODUCCIÓN AL INICIO DEL PERIODO DE SECADO**

### **5.7.1 Evaluación de la interacción de *Panax ginseng* con el antimicrobiano**

El principal objetivo de la terapia antibiótica es eliminar al organismo invasor mediante la administración de una cantidad óptima de droga activa en el sitio de la infección, que supere y mantenga por un tiempo adecuado una

concentración capaz de inhibir al organismo actuante. Esto implica que se debe conocer la susceptibilidad de los organismos actuantes frente a los antibióticos y también los niveles esperados de antibiótico en el sitio de infección luego de su administración. La susceptibilidad de una población de bacterias a un agente antimicrobiano está representada por la CIM de ese agente; mientras que los niveles esperados de antimicrobianos en la leche o tejido donde se localiza la infección está determinada por las propiedades farmacocinéticas de las drogas. Estas propiedades, que son: liposolubilidad, grado de ionización, afinidad de unión con proteínas y tamaño molecular determinan la capacidad de la droga para penetrar los tejidos, su partición entre sangre y leche y la proporción de droga activa no unida a las proteínas *in vivo* (Erskine, 2004). En este estudio, previo a los ensayos de eficacia de PG con animales en producción y con el objetivo de determinar las posibles interacciones entre el extracto de PG y la cefalexina, se evaluó su actividad antimicrobiana combinada con dos concentraciones de PG (0,5 y 3 mg/ml), frente a dos cepas de *S. aureus* mediante ensayos de CIM y CBM.

Al comparar el crecimiento de la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 con las diferentes concentraciones de cefalexina se determinó que tanto en el caldo sin PG como en el caldo con PG en una concentración de 0,5 mg/ml los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la dosis 0,25 µg/ml inclusive, determinando como CIM la dosis inmediata superior de 0,5 µg/ml. En cambio en el caldo con PG en una concentración de 3 mg/ml, los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la dosis de 0,125 µg/ml inclusive, determinando como CIM la dosis inmediata superior de 0,25 µg/ml.

Al comparar el crecimiento de la cepa 17 de *S. aureus* con las diferentes concentraciones de cefalexina se determinó que en el caldo sin PG los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la dosis de 0,5 µg/ml inclusive, determinando como CIM la dosis inmediata superior de 1 µg/ml. En el caldo con PG en una concentración de 0,5 mg/ml y en el caldo con PG en una concentración de 3 mg/ml, los botones indicadores de crecimiento se

visualizaron hasta la dosis de 0,25 µg/ml inclusive, determinando como CIM la dosis inmediata superior de 0,5 µg/ml.

De los resultados obtenidos se puede inferir que si bien el agregado de PG al caldo M-H disminuyó el crecimiento bacteriano tanto de la cepa de referencia como de la cepa de campo de *S. aureus*, la CIM de la cefalexina se mantuvo dentro del rango informado por el NCCLS (*Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests*) (0,12 µg/ml a 0,5 µg/ml). Un efecto similar ocurrió en los ensayos de CBM, observándose que para la concentración de 3 mg/ml de PG la CBM de la cefalexina contra *S. aureus* cepa ATCC 29213 fue de 8 µg/ml, un orden menor que con la dosis de 0,5 mg/ml y caldo sin PG.

Estos hallazgos se relacionan con el trabajo de Sung y Lee (2008) donde combinaron las saponinas del ginseng Coreano Rojo con dos antibióticos comerciales (kanamicina y cefotaxima) para evaluar la actividad antibacteriana contra *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA). Los resultados de estos autores mostraron un efecto sinérgico de los antibióticos con las saponinas contra MRSA, y adjudicaron este efecto a un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática bacteriana que podrían producir las saponinas de PG. Además, un estudio comparativo de la actividad antibacteriana de extractos vegetales de varias regiones de Asia, demostró un efecto antibacteriano de PG sobre MRSA reflejado a través de ensayos de CIM y CBM (Al-Judaibi y col., 2014).

En función de estos trabajos y sumado a los hallazgos obtenidos en este estudio sería interesante determinar cuál es la verdadera interacción de PG con la cefalexina o el mecanismo de acción por cual en combinación con la misma disminuye el crecimiento bacteriano. Estos hallazgos podrían tener importancia clínica y abrirían nuevas perspectivas terapéuticas para su aplicación en la prevención y tratamiento de las mastitis bovinas producidas por bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus*.

### **5.7.2 Eficacia de *Panax ginseng* sobre infecciones intramamarias de vacas en producción al inicio del periodo de secado**

Numerosos antibióticos se utilizan rutinariamente para el tratamiento y la prevención de enfermedades en los rodeos. Actualmente, la mastitis sigue siendo la enfermedad de las vacas lecheras más comúnmente tratada con antibióticos. Se ha estimado a nivel mundial que los antimicrobianos representan el 41% del total de medicamentos utilizados en el ganado bovino (Montforts, 2005). Según los escasos estudios internacionales disponibles, el consumo total de antimicrobianos por año varía ampliamente desde 5393 toneladas en países europeos (Kools y col., 2008) hasta 9300 toneladas en los Estados Unidos de América (Sarmah y col., 2006). En Argentina, Neu y col. (2009) informaron que los beta-lactámicos (entre ellos las cefalosporinas como la cefalexina) y aminoglucósidos son los compuestos IM más frecuentemente utilizados en los tambos de Argentina, mientras que otros compuestos como los macrólidos y las tetraciclinas se administran principalmente para tratar otras enfermedades. Ciertos antimicrobianos se usan de manera profiláctica para prevenir enfermedades que afectan a los animales durante períodos de mayor susceptibilidad, como antibióticos IM en el secado, que es una práctica recomendada en rodeos lecheros para prevenir nuevas IIM durante el periodo de secado (National Mastitis Council, 2006). Sin embargo, la terapia de vaca seca también se administra como tratamiento para IIM subclínicas existentes al final del período de lactancia (Phillips y col., 2004; Aarestrup, 2005). En Argentina, la información sobre el uso de medicamentos veterinarios antimicrobianos a nivel de rodeo es limitada. En un estudio reciente González Pereyra y col. (2015) evaluaron mediante una encuesta la prevalencia de enfermedades y el uso de fármacos antimicrobianos en 18 tambos ubicados principalmente en la provincia de Buenos Aires. Estos autores reportaron que la terapia de vacas seca se realizó con medicamentos IM utilizando un total de 13 fármacos diferentes dentro de los cuales los beta-lactámicos fueron los antimicrobianos más utilizados. Además, el uso de antimicrobianos

intramamarios como fármacos únicos para la mastitis clínica consistió en un 51% de betalactámicos, un 36% de aminoglucósidos, un 6% de macrólidos y un 6% de otro tipo de fármaco.

El tratamiento de secado a todo el rodeo reduce en un 70% el nivel de infección en el período que va del secado al parto, siendo más eficaz que el tratamiento durante la lactancia y permitiendo una mejor regeneración del tejido dañado (Robert y col., 2006). En general los programas de control de mastitis recomiendan tratar todos los animales al final de su lactancia. El tratamiento de secado a todo el rodeo reduce significativamente la incidencia de IIM durante el período seco en animales sin IIM en el momento del secado. Esto es debido a la persistencia de las preparaciones antibióticas de liberación lenta durante las etapas iniciales y medias del período seco y probablemente a un sellado más rápido del canal del pezón en los animales tratados. Sin embargo, las sustancias antimicrobianas utilizadas para terapia de secado generalmente no persisten en la ubre hasta el parto y por lo tanto no ofrecen protección en ese momento (Oliver y col., 1990). Las preparaciones de vacas secas están formuladas para causar una irritación mínima del tejido, evitar daños en el tejido secretor y prevenir la fibrosis. Se elige un antibiótico que sea activo contra organismos grampositivos en bajas concentraciones, y si se usan combinaciones, se prefieren los antibióticos con efectos bactericidas. Combinaciones antibióticas de cloxacilina, ampicilina, cefapirina, estreptomina, cefalexina, penetamato, eritromicina, amoxicilina, penicilina, nafcilina se utilizan con frecuencia (Bogni y col., 2011).

Un cambio en la epidemiología de la mastitis ha enfatizado el papel del sistema inmune de la GM en la patogenia de estas infecciones. De hecho, ciertos patógenos como *S. aureus* desencadenan una amplia interacción con el sistema inmune durante las fases de invasión y colonización y la actividad de las células inmunes de la ubre es fundamental para lograr altas tasas de curación (Anderson, 1976; Craven y Anderson, 1984). Por lo tanto, si la capacidad inmune de la GM bovina pudiera mejorarse, la susceptibilidad a los patógenos

causantes de mastitis podría reducirse y la efectividad de los antibióticos podría aumentar (Zecconi y col., 1999).

En este estudio, se incluyeron 102 vacas en producción que fueron tratados al momento del secado con dos formulaciones de aplicación IM. Los animales se distribuyeron en dos grupos y fueron tratados al azar con formulaciones conteniendo PG + cefalexina o cefalexina en sus cuatro cuartos. Es importante destacar que a la fecha no existen en la bibliografía consultada ensayos de eficacia en los cuales se haya utilizado PG en combinación con antimicrobianos como terapia de secado en vacas al final de la lactancia. Asimismo, si bien existen numerosos trabajos en los que se han evaluado los efectos inmunomoduladores de diferentes extractos provenientes de plantas para el tratamiento de mastitis clínicas y subclínicas durante la lactancia y el secado (Mukherjee, 2009; Kaithwas y col., 2011; Mullen y col., 2013; Bhatt y col., 2015), ninguno de estos estudios incluye pruebas de eficacia *in vivo* en vacas en producción.

En este trabajo el 23,84% de los cuartos mamarios (n=101) presentaron IIM por diferentes patógenos al momento del secado. Los dos microorganismos más prevalentes aislados a partir de leche antes del tratamiento de secado fueron *S. aureus* (8,10%) y SCN (5,10%). En un tercer orden se ubicaron los *Streptococcus no agalactiae* (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus spp*). Estos resultados se relacionan con los datos publicados en los últimos años sobre prevalencia de patógenos contagiosos en tambos de Argentina. En un estudio que incluyó muestras de 20.117 vacas en lactancia pertenecientes a 112 tambos ubicados en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires relevados entre mayo de 1999 y agosto de 2007 por presentar problemas de mastitis, mostró que los patógenos aislados con mayor frecuencia fueron *S. aureus* con el 57%, *S. agalactiae* 29%; mientras que los miembros del grupo de *Sreptococcus no agalactiae* fueron hallados en el 12% de los animales. *Staphylococcus aureus* fue aislado casi en la totalidad de los rodeos analizados (>97%) (Signorini y col., 2008). En un estudio más reciente, que incluyó un relevamiento aleatorizado realizado sobre 2.296 vacas pertenecientes a 51 rodeos lecheros de la Provincia

de Córdoba, 54% mostraron mastitis subclínica evidenciada por recuentos de células somáticas  $\geq 200.000/\text{ml}$ . A partir de estas muestras, los organismos patógenos más frecuentemente aislados fueron SCN 52,1%, seguidos por *S. aureus* 21,3%, *Corynebacterium* spp. 5,2%, *S. agalactiae* (4,4%) y *S. dysgalactiae* (4,4%) (Dieser y col., 2014).

En el presente trabajo, incluyendo en el análisis el total de cuartos mamarios sanos (n=329) e infectados (n=103) al momento del secado, no se detectó un efecto significativo del tratamiento sobre nuevas IIM al pos parto; observándose en los cuartos tratados con cefalexina, una prevalencia de IIM al pos parto del 26,9% y en los cuartos tratados con PG + cefalexina una prevalencia similar del 23,3%. Por lo tanto, el tratamiento al secado con PG + cefalexina, no tuvo un efecto preventivo sobre las nuevas IIM dentro de las 24 hs pos parto comportándose en forma similar a la cefalexina.

La incidencia de IIM durante el período seco e inmediatamente después del parto es un factor importante para mantener la salud de la GM (Oliver 1988). Si bien no todas las infecciones derivarán en casos de mastitis clínica, la presencia de una IIM aumenta el riesgo de mastitis clínica dentro de los 7 días pos parto (Green y col., 2002). Idealmente, los tratamientos administrados durante el secado deberían permanecer en la GM durante todo el período para proteger contra las nuevas IIM.

En el presente trabajo analizando el total de cuartos mamarios sanos al momento del secado (n=329), no se detectaron diferencias en la aparición de nuevas IIM entre los dos tratamientos, observándose porcentaje similares (16% para los tratados con cefalexina y 12,6% para los tratados con PG + cefalexina). Estos datos indican que el tratamiento con PG + cefalexina aplicado en cuartos mamarios libres de infección, no tuvo efecto preventivo sobre las nuevas IIM al pos parto, comportándose en forma similar a la cefalexina. Los porcentajes promedios de nuevas infecciones que se obtuvieron en este estudio están dentro de los rangos informados en otros trabajos en los cuales se emplearon diferentes tratamientos de secado. Bryan y col., (2011) en un estudio que incluyó 1570 vacas de 4 establecimientos, las cuales fueron tratadas al secado con dos

formulaciones comerciales diferentes de cefalonium 250 mg (cefalosporina semi-sintética de primera generación) de larga acción observaron que la incidencia de nuevas IIM por cuarto dentro de los 2 a 5 días pos parto fueron del 17%. Cabe destacar en que nuestro estudio la dosis de cefalexina fue menor (100 mg) a la utilizada por Bryan y col. (2011) de 250 mg.

En otro estudio, Mullen y col. (2013) compararon diferentes productos comerciales que fueron aplicados al momento del secado y detectaron que los porcentajes de nuevas infecciones alrededor de los 3 y 5 días pos parto no variaron entre los tratamientos, observando efectos similares a los reportados en este estudio sobre la prevención de nuevas IIM. En el mencionado estudio, en los cuartos tratados con terapia convencional (penicilina-dihidroestreptomicina y subnitrito de bismuto) los porcentajes de nuevas IIM fueron de un  $24 \pm 21\%$ , en los tratados con sellador interno comercial a base de hierbas de un  $15 \pm 7\%$ ; en los tratados con un producto comercial de aplicación IM a base de hierbas de un  $30 \pm 10\%$  y para los que no recibieron ningún tipo de tratamiento de un  $35 \pm 11\%$ .

En el presente estudio, la distribución y prevalencia de los patógenos aislados de secreción mamaria dentro de las 24 hs posteriores al parto fueron similares a los detectados antes del secado, observándose los mayores porcentajes para *S. aureus* (8,60%) y SCN (7,60%). Los *Streptococcus no agalactiae* (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus spp*) se presentaron en un tercer orden pero con una baja prevalencia (1,60%).

La tasa de cura en los cuartos mamarios infectados al momento del secado fue similar para ambos tratamientos (36,1% para los tratados con cefalexina y 36,4% para los tratados con PG + cefalexina). Estos porcentajes son menores a los observados por Bryan y col. (2011) donde obtuvieron tasas de cura entre 75 y 78% en los cuartos tratados con dos formulaciones comerciales de cefalonium. En nuestro trabajo, un dato a tener en cuenta es que de los 101 cuartos infectados al momento del secado, 31 correspondían a infecciones por *S. aureus* (8,1%). Se conoce ampliamente la capacidad de *S. aureus* para persistir en el interior de las células epiteliales y fagocíticas profesionales presentes en la GM,

considerándose una estrategia del patógeno para evadir al sistema inmune y para protegerse de la acción de los antibióticos, ocasionando de esta forma infecciones crónicas difíciles de curar (Oviedo-Boyso y col., 2008). Por otra parte, la probabilidad de cura de los cuartos mamarios infectados al secado, disminuyó significativamente en aquellos animales de más de dos lactancias tratados con PG + cefalexina. Este resultado hace suponer que los animales con más de dos lactancias podrían cursar IIM crónicas tornándose más difícil la cura bacteriológica con los antibióticos convencionales.

Una tasa de cura real de *S. aureus* puede variar entre un 20% y 78% (Dingwell y col., 2003a). En el presente trabajo, los cuartos mamarios que presentaban IIM por *S. aureus* al momento del secado (n=35) y que fueron tratados con cefalexina, tuvieron una tasa de cura del 85,8%. La misma fue mayor a la estimada por Bryan y col. (2011) de 68.6% en aquellos cuartos infectados con *S. aureus* al secado, tratados con dos preparaciones comerciales de cefalonium. En cambio, en los que fueron tratados con PG + cefalexina la tasa de cura fue significativamente menor (28,2%). Si bien este último porcentaje se encuentra dentro del rango mencionado por la bibliografía, esta disminución significativa en la tasa de cura podría relacionarse con la multiplicación de la bacteria en el ambiente de la GM en presencia del inmunomodulador, sobre todo si se tienen en cuenta los resultados observados *in vitro*, donde la adición al medio de cultivo de 3 mg/ml de PG incrementó el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, un aspecto a considerar en este resultado que podría influir en la significancia estadística hallada en las tasas de cura, es el número de cuartos infectados con *S. aureus* al momento del secado (n=35); un incremento en el número de animales en este estudio podría incidir en el resultado. Otro punto a considerar en este trabajo es que la estimación de la tasa de cura bacteriológica durante el período seco se realizó en base a un solo muestreo de leche después del parto, por lo cual podría resultar en una sobrestimación o en una subestimación de la eficacia de la terapia de vaca seca; esto es especialmente probable para bacterias como *S. aureus*, que se desprenden de forma intermitente de los cuartos mamarios infectados. Por otra

parte, la probabilidad de cura de los cuartos mamarios infectados al secado con *S. aureus*, disminuyó significativamente en aquellos animales de más de dos lactancias tratados con PG + cefalexina lo que podría indicar el curso crónico de las IIM causadas por este patógeno en este grupo de animales.

Los SCN, constituyen un grupo de especies estafilocócicas, que se han convertido en los patógenos predominantes causantes de mastitis en numerosos países (Taponen y col., 2007; Kateete y col., 2013; Abrahmsén y col., 2014). En Argentina, provincia de Córdoba, se ha demostrado recientemente que los patógenos más frecuentemente aislados fueron los SCN (52,1%), seguido por *S. aureus* (21,3%) (Dieser y col., 2014). Aunque los SCN suelen causar mastitis clínicas o subclínicas leves, son perjudiciales ya que aumentan el RCS en la leche (Chaffer y col., 1999). Ciertas evidencias también indican que los SCN son capaces de persistir en la GM durante meses o incluso a lo largo de toda la lactancia (Aarestrup y col., 1999). En general las mastitis causada por SCN responden bien al tratamiento antimicrobiano (Taponen y col., 2007) y en algunos países se recomienda su tratamiento, pero en otros las mastitis leves y subclínicas no se tratan (Oliver y col., 2003). En el presente trabajo, si bien la tasa de nuevas IIM para SCN al pos parto fueron menores en los cuartos tratados con PG + cefalexina (4,3%) en relación a los tratados con cefalexina (7,3%), las diferencias entre tratamientos no fueron significativas. Por otra parte, si bien la tasa de cura al pos parto temprano fue mayor en los cuartos tratados con PG + cefalexina (95,5%) en comparación con los tratados con cefalexina (69,8%), no se detectaron diferencias estadísticas significativas; aunque el valor de  $p=0,130$  estimado indicó una tendencia. En este punto, al igual que para *S. aureus*, un incremento en el número de animales iniciales incluidos en el diseño experimental podría tener influencia en las significancias estadísticas halladas en este estudio.

En relación al efecto de los tratamientos sobre los patógenos contagiosos los resultados fueron similares a los hallados para *S. aureus* (patógeno con mayor prevalencia al secado y al pos parto en relación a los demás patógenos incluidos en esta categoría). Por otra parte, en relación al efecto de los

tratamientos sobre los patógenos ambientales, los resultados fueron similares a los hallados para los SCN (microorganismos con mayor prevalencia al secado y al pos parto en relación a los demás microorganismos incluidos en esta categoría).

Como conclusión general se puede afirmar que la eficacia del tratamiento con PG + cefalexina como terapia de secado fue similar a la terapia con cefalexina no observándose efectos adversos aparentes con la combinación del inmunomodulador y el antimicrobiano. El tratamiento con PG + cefalexina mostró similares tasas de nuevas infecciones al pos parto en relación a la terapia con cefalexina. Aunque las tasas de cura fueron similares entre PG + cefalexina y cefalexina específicamente, para el grupo de SCN, se necesitarían futuros estudios con mayor número de muestras para cerrar las conclusiones.

### **5.7.3 Efecto de *Panax ginseng* sobre la producción de leche y el recuento de células somáticas en la lactancia posterior al tratamiento**

En las vacas lecheras, un adecuado periodo de secado de 40/60 días mejora la proliferación celular maximizando la producción y calidad láctea (grasa y proteínas) en la lactancia siguiente (Capuco y col. 1997; Kuhn y col., 2005; Sawa y col., 2012). En este periodo la glándula sufre procesos de remodelación, incluyendo regresión (apoptosis), proliferación y diferenciación mamaria. Se ha demostrado que la aplicación IM de PG al momento de la interrupción de la lactancia, estimula la remodelación del tejido mamario, aumentando en forma significativa la apoptosis de las células epiteliales y estromales (Dallard y col., 2011) y modificando la expresión génica y proteica de componentes de la familia del factor de crecimiento análogo a insulina (IGF) (Dallard y col., 2011, 2013); lo cual contribuiría a acelerar el proceso de involución de la GM bovina. Estos resultados previos nos llevaron a sugerir que el tratamiento con PG al momento del secado podría contribuir a aumentar la producción láctea en la lactancia siguiente. En el presente estudio si bien, a partir del cuarto mes de lactancia los litros promedios producidos por las vacas

tratadas con PG + cefalexina fueron mayores a los registrados en las vacas tratadas con cefalexina, no se observó un efecto significativo del tratamiento sobre la producción de leche a lo largo de la lactancia. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Mullen y col. (2013) que observaron que el tratamiento con terapia antibiótica convencional en comparación con diferentes combinaciones comerciales de hierbas no tuvieron efectos sobre la producción de leche en la lactancia siguiente.

El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la GM lactante (Wolter y Kloppert, 2004). El RCS representa una herramienta analítica rápida y segura, y sus resultados permiten hacer asociaciones sobre estado inmunológico en que se encuentra el animal (O'Brien y col., 1999; Leitner, y col., 2000). La mastitis es uno de los factores de mayor influencia en el RCS de la leche (Harmon, 2001). El RCS proveniente de secreciones de cuartos mamarios libres de IIM es usualmente menor a 200.000 células/ml y es frecuente observar animales que mantienen valores de recuento menores a 100.000 células/ml. Cuando las bacterias causantes de mastitis invaden la GM, los macrófagos presentes en la misma alertan al sistema inmunológico del animal estimulando el aflujo de neutrófilos al sitio de infección, lo que conduce a la eliminación del agente infeccioso. Más del 90% del RCS en glándulas infectadas está compuesto de neutrófilos, mientras que los macrófagos y linfocitos forman parte de un 2-10% del RCS (Lee y col., 1980).

En el presente trabajo se evaluó el efecto del tratamiento con PG + cefalexina sobre el RCS durante los 10 meses de lactancia posteriores al tratamiento. Si bien al quinto mes de lactancia se observó un aumento en el RCS en las vacas tratadas con cefalexina en relación a las tratadas con PG + cefalexina, no se observó un efecto del tratamiento sobre los RCS a lo largo de los 10 meses evaluados. Estos resultados concuerdan con los de Mullen y col. (2013) que observaron que el tratamiento con terapia antibiótica convencional en comparación con diferentes combinaciones comerciales de hierbas no tuvieron efectos sobre el RCS en la lactancia siguiente. El aumento en

el RCS observado al quinto mes de lactancia en los animales que fueron tratados con cefalexina al secado podría relacionarse con factores climáticos o factores inherentes al manejo de los establecimientos.

Como conclusión general se puede afirmar que el tratamiento IM con PG + cefalexina como terapia de secado no tuvo efectos negativos sobre la producción de leche o el RCS en la lactancia posterior al tratamiento.

## 6. CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos y su discusión con los aportes de otros autores, permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

### 6.1 Efecto inmunomodulador de *Panax ginseng* en cultivos de células bovinas

- Ninguna de las concentraciones de PG utilizadas *in vitro* con la línea celular MAC-T y macrófagos aislados de secreción mamaria, fue tóxica para las células hasta las 24 hs posteriores al tratamiento.
- En MAC-T, si bien la expresión génica de TLR4 fue significativamente mayor luego del tratamiento con diferentes concentraciones de PG con respecto a los controles, no se observó un efecto significativo del tiempo de muestreo ni de la interacción entre ambos factores.
- En MAC-T, la expresión génica de NF- $\kappa$ B fue significativamente mayor luego del tratamiento con diferentes concentraciones de PG con respecto a los controles, observándose un efecto significativo del tiempo de muestreo pero no de la interacción entre tratamiento y tiempo.
- En macrófagos aislados de secreción mamaria, la expresión génica de TLR2, no se vio afectada por el tratamiento con las diferentes concentraciones de PG en relación a los controles.
- En macrófagos, la expresión génica de TLR4, se vio significativamente influenciada por el tratamiento con PG, observándose a las 2, 12 y 24 hs los mayores niveles de expresión en relación a los controles.
- En macrófagos, la expresión génica de NF- $\kappa$ B, se vio significativamente influenciada por el tratamiento, observándose además una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo de muestreo. Los mayores niveles de expresión génica en los macrófagos tratados con PG en relación a los del grupo control se detectaron a las 12 y 24 hs.
- En MAC-T, el tratamiento con PG aumentó en forma significativa la expresión génica y proteica de IL-6 a las 12 y 24 hs pt y la producción proteica de IL-4 a las 24 hs.

- En macrófagos, se detectó un efecto significativo del tratamiento con PG y del tiempo de exposición con respecto a los controles sobre IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , observándose los mayores niveles de expresión a las 12 y 24 hs pt. La expresión génica para IL-6 si bien se vio influenciada significativamente por el tiempo de exposición al PG, no se detectó efecto del tratamiento, observándose los mayores niveles de expresión a las 12 y 24 hs pt.
- Con respecto a la puesta a punto del silenciamiento génico de los receptores TLR2 y TLR4, no se lograron optimizar las condiciones de los ensayos requeridos para concluirla.
- PG estimuló en forma significativa el crecimiento *in vitro* de las cepas Newbould 305 y cepa 5011 de *S. aureus*, en caldo M-H pH normal y modificado (similar al de la leche bovina). Sin embargo, en MAC-T, el tratamiento con PG redujo en forma significativa la internalización de las dos cepas estudiadas.
- El tratamiento con PG no influyó en la capacidad fagocítica de macrófagos, ni en la funcionalidad de los mismos cuando estuvieron en contacto con *S. aureus*.

## 6.2 Eficacia de *Panax ginseng* en pruebas de campo

- El tratamiento al secado con PG + cefalexina aplicado en cuartos mamarios infectados y libres de infección, no tuvo un efecto preventivo sobre las nuevas IIM dentro de las 24 hs pos parto comportándose en forma similar a la cefalexina.
- El tratamiento con PG + cefalexina aplicado en cuartos mamarios libres de infección, no tuvo efecto preventivo sobre las nuevas IIM al pos parto, comportándose en forma similar a la cefalexina.
- La tasa de cura en los cuartos mamarios infectados al momento del secado fue similar para ambos tratamientos. La probabilidad de cura de los cuartos mamarios infectados al secado, disminuyó significativamente

en aquellos animales de más de dos lactancias tratados con PG + cefalexina.

- La tasa de nuevas IIM por *S. aureus* fueron menores con el tratamiento de PG + cefalexina en relación al tratamiento con cefalexina, aunque esta diferencia no fue significativa.
- La tasa de cura de los cuartos mamarios que presentaban IIM por *S. aureus* al momento del secado fue significativamente menor en los cuartos tratados con PG + cefalexina en comparación con los tratados con cefalexina. En los cuartos tratados con PG + cefalexina, la probabilidad de cura de *S. aureus*, disminuyó significativamente en aquellos animales de más de dos lactancias en comparación con los tratados con cefalexina.
- La tasa de nuevas IIM para SCN fueron menores en los cuartos tratados con PG + cefalexina en relación a los tratados con cefalexina, aunque las diferencias entre tratamientos no fueron significativas.
- Si bien la tasa de cura para SCN fue mayor en los cuartos tratados con PG + cefalexina en comparación con los tratados con cefalexina, no se detectaron diferencias estadísticas significativas, pero sí una tendencia.
- No se observó un efecto significativo del tratamiento sobre la producción de leche y el RCS a lo largo de la lactancia.

En conjunto, los resultados *in vitro* sugieren que PG induce una acción inmunoestimulante sobre MAC-T y macrófagos induciendo la expresión de receptores de la inmunidad innata, principalmente TLR4, así como también de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas y que la fuente principal de estos mediadores inflamatorios estaría dada por los macrófagos de la GM. Por su parte, en respuesta al tratamiento con PG, las células epiteliales mamarias serían fuente de citoquinas con un perfil anti-inflamatorio, lo que podría contribuir a regular el proceso inflamatorio en la GM. El efecto inmunoestimulante junto a la inhibición de la internalización de *S. aureus* a la

célula epitelial, podría reducir el riesgo de invasión de la bacteria al tejido, la diseminación de la infección y la persistencia del patógeno en la GM.

El potencial de PG para prevenir o curar IIM durante el secado debería continuar estudiándose en ensayos de eficacia que impliquen un mayor número de animales que los empleados en este estudio.

El presente trabajo ha sido de utilidad para conocer más acerca de los efectos de PG como MRI, su mecanismo de acción en células de cultivo y su eficacia en combinación con cefalexina en vacas durante el periodo de involución mamaria.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

A decorative graphic consisting of several parallel, curved lines in a spectrum of colors (yellow, orange, blue, purple, pink) that originate from the bottom left and curve upwards and to the right, ending at the bottom right corner of the page.

- Aarestrup FM**, Larsen HD, Jensen NE. 1999. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains from cases of bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 66:165-170.
- Aarestrup FM.** 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 96:271-281.
- Abbas AK**, Litchman AH, Pillai S. 2012. *Inmunología celular y molecular.* Séptima edición. ISBN edición Española: 978-84-8086-916-4.
- Abrahmsén M**, Persson Y, Kanyima BM, Bage R. 2014. Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod.* 46:99-105.
- Adams DO, Hamilton TA.** 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Genet.* 2:283-318.
- Adaska JM**, Silva AJ, Berge AC, Sisco WM. 2006. Genetic and Phenotypic Variability among *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Isolates from California Dairy Cattle and Humans. *Appl Environ Microbiol.* 72:6632-6637.
- Ahn JY**, Choi IS, Shim JY, Yun EK, Yun YS, Jeong G, Song JY. 2006a. The immunomodulator ginsan induces resistance to experimental sepsis by inhibiting Toll-like receptor mediated inflammatory signals. *Eur J Immunol.* 36:37-45.
- Ahn JY**, Song JY, Yun YS, Jeong G, Choi IS. 2006b. Protection of *Staphylococcus aureus*-infected septic mice by suppression of early acute inflammation and enhanced antimicrobial activity by ginsan. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46:187-197.
- Aitken SL**, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16:291-304.
- Akira S**, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124:783-801.
- Akira S, Takeda K.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Semin Immunol.* 16:3-9.

- Alexander EH, Hudson MC.** 2001. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 56:361–366.
- Al-Judaibi A, Al-Zahrani A, Altammar KA, Ismail SB, Darweesh NT.** 2014. Comparative study of antibacterial activity of plant extracts from several regions of Asia. *Am J Pharmacol Toxicol.* 9:139–147.
- Alluwaimi AM.** 2004. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Res Vet Sci.* 77:211–222.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry J, Oliver SP.** 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 79:1021–1026.
- Almeida RA, Oliver SP.** 2001. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 31:205–212.
- Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE.** 2012. Short chain fatty acids propionic and hexanoic decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet Microbiol.* 155:324–331.
- Alva-Murillo N, Téllez- Pérez AD, Medina-estrada I, Alvarez- Aguilar C, Ochoa-Zarzosa A, López- Meza JE.** 2014a. Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microb Pathog.* 77:24–30.
- Alva-Murillo N, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A.** 2014b. Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Anderson JC.** 1976. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *Br Vet J.* 132:229–245.
- Andreotti CS, Baravalle C, Sacco SC, Lovato M, Pereyra EAL, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE.** 2017. Characterization of immune response in *Staphylococcus aureus* chronically infected bovine mammary

glands during active involution. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 54:51-60.

**Angelini DJ**, Hasday JD, Goldblum SE, Bannerman DD. 2005. Tumor necrosis factor mediated pulmonary endothelial barrier dysfunction. *Curr Respir Med Rev.* 1:233-246.

**Arai K**, Lee F, Miyajima A, Miyataka S, Narai N, Yokota T. 1990. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem.* 59:783-836.

**Archer NK**, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2:445-459.

**Asai K**, Kai K, Rikiishi H, Sugawara S, Maruyama Y, Yamaguchi T, Ohta M, Kumagai K. 1998. Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet Immunol Immunopathol.* 65:51-61.

**Asea A**, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and 4. *J Biol Chem.* 277:15028-15034.

**Asea JW**, Bannerman DD, Paape MJ, Huang MK, Zhao X. 2006. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet Res.* 37:219-229.

**Atalla H**, Gyles C, Jacob CL, Moisan H, Mallard B. 2008. Characterization of a *Staphylococcus aureus* Small Colony Variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog Dis.* 6:785-799.

**Attele AS**, Wu JA, Yuan CS. 1999. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol.* 58:1685-1693.

- Bannerman DD**, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. Clin Diagn Lab Immunol. 11:463-472.
- Bannerman DD, Wall RJ**. 2005. A novel strategy for the prevention of *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. ISB News Report.1-4.
- Bannerman DD**. 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. J Anim Sci. 87:10-25.
- Baravalle C**, Dallard BE, Ortega HH, Neder VE, Canavesio VR, Calvinho LF. 2010. Effect of *Panax ginseng* on cytokine expression in bovine mammary glands at drying off. Vet Immunol Immunop. 138:224-230.
- Baravalle C**, Dallard BE, Cadoche MC, Pereyra EA, Neder VE, Ortega HH, Calvinho LF. 2011a. Proinflammatory cytokines and CD14 expression in mammary tissue of cows following intramammary inoculation of *Panax ginseng* at drying off. Vet Immunol Immunop. 144:52-60.
- Baravalle C**, Dallard BE, Cadoche MC, Henzenn HI, Ortega HH, Calvinho LF. 2011b. Evaluación de los niveles de expresión de la proteína adaptadora MyD88 y NFκB en glándula mamaria bovina inoculada con un inmunomodulador al momento del secado. IV Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria, Río Cuarto, Córdoba. Resumen: 47.
- Baravalle C**, Silvestrini P, Cadoche MC, Beccaria C, Andreotti CS, Renna MS, Pereyra EA, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE. 2015. Intramammary infusion of *Panax ginseng* extract in bovine mammary gland at cessation of milking induces changes in the expression of toll-like receptors, MyD88 and NF-κB during early involution. Res Vet Sci. 100:52-60.

- Bedolla C, Castañeda V.** 2003. Agentes patógenos causantes de la mastitis bovina. Cuatro Vientos. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 38:27-29.
- Belardelli F, Ferrantini M.** 2002. Cytokine as a link between innate and adaptive antitumor immunity. Trends Immunol. 23:201-208.
- Ben Zakour NL, Sturdevant DE, Even S, Guinane CM, Barbey C, Alves PD, Cochet MF, Gautier M, Otto M, Fitzgerald JR, Le Loir Y.** 2008. Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. J. Bacteriol. 190:6302- 6317.
- Bermejo V, Spadaccini L, Elbert G, Duarte A, Erbin M, Cahn P.** 2012. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. Medicina. 72:283-286.
- Beutler BA.** 2009. TLRs and innate immunity. Blood. 113:1399-1407.
- Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM.** 1996. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation. Ann Surg. 224:647-664.
- Blumenthal M.** 2003. The ABC Clinical Guide to Herbs. American Botanical Council.
- Bogni C, Odierno L, Raspanti C, Giraud J, Larriestra A, Reinoso E, Lasagno M, Ferrari M, Ducro's E, Frigerio C, Bettera S, Pellegrino M, Frola I, Dieser S, Vissio C.** 2011. War against mastitis: current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. Mendez-Vilas A (ed). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. World Scientific. 483-494.
- Bomford R, Court L.** 1989. Adjuvants for Anti-parasite Vaccines. Parasitol Today. 5:41-46.
- Booth JM.** 1975. Mastitis control in the field: some results of two large field trials. Proc. Natl. Mastitis Counc. 19-31.

- Bouchard D**, Peton V, Almeida SLe, Maréchal C, Miyoshi A, Azevedo V, Berkova N, Rault L, François P, Schrenzel J, Even S, Hernandez D, Le Loir Y. 2012. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. J Bacteriol Res. 194:6292-6293.
- Bougarn S**, Cunha P, Harmache A, Fromageau A, Gilbert FB, Rainard P. 2010. Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. Clin Vaccine Immunol. 17:1797-1809.
- Boulanger D**, Bureau F, Melotte D, Mainil J, Lekeux P. 2003. Increased nuclear factor B activity in milk cells of mastitis-affected cows. J Dairy Sci. 86:1259-1267.
- Bowdish DM**, Loffredo MS, Mukhopadhyay S, Mantovani A, Gordon S. 2007. Macrophage receptors implicated in the "adaptive" form of innate immunity. Microbes Infect. 9:1680-7.
- Bradley AJ**. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. Vet J. 164:116-128.
- Bradley AJ, Green MJ**. 2004. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 20:547-568.
- Bragulla H**, König HE, Budras KD. 2003. The Udder. Bovine Anatomy. 1° Ed. Germany. 88-89.
- Bruckmaier RM, Wellnitz O**. 2017. Triennial lactation symposium / bolfa: Pathogen-specific immune response and changes in the blood - milk barrier of the bovine mammary gland. Anim Sci. 12:5720-5728.
- Bryan MA**, Heuer C, Emslie FR. 2011. The comparative efficacy of two long-acting dry-cow cephalonium products in curing and preventing intramammary infections. NZVJ. 59:166-173.
- Burakova Y**, Madera R, Mcvey S, Schlup JR. 2017. Adjuvants for Animal Vaccines. 0:1-12.

- Buzzola FR**, Alvarez LP, Tuchscher LPN, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvinho L, Sordelli DO. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect. Immun.* 75:886–891.
- Byeon SE**, Lee J, Kim JH, Yang WS, Kwak YS, Kim SY, Choung ES, Rhee MH, Cho JY. 2012. Molecular mechanism of macrophage activation by red ginseng acidic polysaccharide from Korean red ginseng. *Mediators Inflamm.* 2012:7.
- Calvinho LF**, Almeida RA, Oliver SP. 1996. Influence of *Streptococcus dysgalactiae* surface hydrophobicity on adherence to mammary epithelial cells and phagocytosis by mammary macrophages. *Zentralbl Veterinarmed B.* 43:257-66.
- Calvinho LF**, Almeida R, Oliver S. 1998. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 61:93-110.
- Calvinho LF, Tirante L.** 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE Sec. Cs Vet.* 4:29-40.
- Calvinho LF.** 2007. Control de mastitis causadas por estreptococos ambientales. Jornada APROCAL -INTA Rafaela.
- Campbell JJ**, Botos LA, Sargeant TJ, Davidenko N, Cameron RE, Watson CJ. 2014. A 3-D in vitro co-culture model of mammary gland involution. *Integr Biol (Camb).* 6:618-626.
- Campos M**, Godson D, Hughes H, Babiuk L, Sordillo L. 1993. The role of biological response modifiers in disease control. *J Dairy Sci.* 76:2407-2412.
- Cannon GJ, Swanson JA.** 1992. The macrophage capacity for phagocytosis. *J Cell Sci.* 101:907–913.
- Capita R, Alonso-Calleja C.** 2013. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53:11–48.

- Capuco AV, Akers RM, Smith JJ.** 1997. Mammary growth in holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. *J Dairy Sci.* 80:477-487.
- Capuco AV, Ellis SE.** 2005. Bovine mammary progenitor cells: current concepts and future directions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 10:5-15.
- Carthew RW, Sontheimer EJ.** 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 136:642-655.
- Castro F, Rojas P, Rodríguez L.** 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. *Rev Agro-Ciencia.* 22:49-58.
- Cermakova J, Kudrna V, Simeckova M, Vyborna A, Dolezal P, Illek J.** 2014. Comparison of shortened and conventional dry period management strategies. *J Dairy Sci.* 97:5623-5636.
- Cha E, Bar D, Hertl JA, Tauer LW, Bennett G, Gonzalez RN, Schukken YH, Welcome FL, Grohn YT.** 2011. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. *J Dairy Sci.* 94:4476-4487.
- Chaffer M, Leitner G, Winkler M, Glickman A, Krifucks O, Ezra E, Saran A,** 1999. Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows. *J Vet Med.* 46:707-712.
- Chen YG, Zhang Y.** 2001. Chemistry of dammarane type ginsenosides. *J Yunnan Normal Univ.* 21:39-42
- Choi HS, Kim KH, Sohn E, Park JD, Kim BO, Moon EY, Rhee DK, Pyo S.** 2008. Red ginseng acidic polysaccharide (RGAP) in combination with IFN-gamma results in enhanced macrophage function through activation of the NF-kappaB pathway. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72:1817-1825.
- Choi HS, Seo HS, Kim SR, Choi YK, Shin YC, Ko SG.** 2014. Anti-inflammatory and anti-proliferative effect of herbal medicines (apr) in raw264.7 cells. *Mol Med Rep.* 9:1569-1574.

- Choi YH**, Jin GY, Li GZ, Yan GH. 2011. Cornuside suppresses lipopolysaccharide induced inflammatory mediators by inhibiting nuclear factor-kappa B activation in RAW 264.7 macrophages. *Biol Pharm Bull.* 34:959- 966.
- Christman JW**, Sadikot RT, Blackwell TS. 2000. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in pulmonary diseases. *Chest.* 117:1482-1487.
- Concha C**, Hu S, Holmberg O. 1996. The proliferative responses of cow stripping milk and blood lymphocytes to pokeweed mitogen and ginseng *in vitro*. *Vet Res.* 27:107-115.
- Conley J**, Olson M, Cook LS, Ceri H, Phan V, Davies HD. 2003. Biofilm formation by group a Streptococci: is there a relationship with treatment failure. *J Clin Microbiol.* 41:4043-4048.
- Cooray R.** 1996. Casein effects on the myeloperoxidase mediated oxygen-dependent bactericidal activity of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 51:55-65.
- Cordeiro AS**, Alonso MJ, De la Fuente M. 2015. Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides. *Biotechnol Adv.* 33:1279-1293.
- Cork MJ, Duff GW.** 1994. Interleukin-1. Luger TA, Schwarz T. eds. *Epidermal growth factors and cytokines.* New York: Marcel Dekker. 19-48
- Cox JC, Coulter AR.** 1997. Adjuvants a classification and review of their modes of action. *Vaccine.* 15:248-256.
- Craven N, Anderson JC.** 1984. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *in vitro* and *in vivo*. *J Dairy Sci.* 51:513-523.
- Cucarella C**, Tormo MA, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ, Penadés JR. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun.* 70:3180-3186.

- Cucarella C**, Ángeles Tormo M, Ubeda C, Pilar Trotonda M, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JS. 2004. Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 72:2177-2185.
- Dallard BE**, Ruffino V, Heffel S, Calvinho LF. 2007. Effect of a biological response modifier on expression of growth factors and cellular proliferation at drying off. J Dairy Sci. 90:2229-2240.
- Dallard BE**, Baravalle C, Ortega H, Ruffino V, Heffel S, Calvinho LF. 2008. Effect of a biological response modifier on cellular death mechanisms at drying off. J Dairy Res. 75:167-175.
- Dallard BE**, Baravalle C, Ortega HH, Tumini M, Canavesio VR, Neder VE, Calvinho LF. 2009. Effect of a biological response modifier on expression of CD14 receptor and tumor necrosis factor- $\alpha$  in *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands at drying off. Vet Immunol Immunop. 32:237-242.
- Dallard BE**, Ortega HH, Iguzquiza IA, Salvetti NR, Quaino OA, Calvinho LF. 2010. The effect of a single intramammary infusion of a biological response modifier in cows at drying off. Vet Res Commun. 34:519-532.
- Dallard BE**, Baravalle C, Andreotti A, Ortega HH, Neder V, Calvinho LF. 2011. Intramammary inoculation of *Panax ginseng* extract in cows at drying off enhances early mammary involution. J Dairy Res. 78:63-71.
- Dallard BE**, Pujato SA, Baravalle C, Pereyra E, Rey F, Renna MS, Calvinho LF. 2013. Intramammary infusion of *Panax ginseng* extract in the bovine mammary gland at cessation of milking modifies components of the insulin-like growth factor system during involution. Res Vet Sci. 94:462-470.
- Dana H**, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A., Mehmandoost N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V, Ebrahimi M, Rashno MM, Abadi SJ, Gharagouzlo E. 2017. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. IJBS. 13:48.

- DANMAP** (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme). 2003. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark 2003. DANMAP, So-borg, Denmark.
- Dayan AD.** 1993. Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. *Vet Microbiol.* 35:213-226.
- De UK, Mukherjee R.** 2009. Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk cells in response to *Azadirachta indica* during bovine mastitis. *Trop Anim Health Prod.* 41:189-197.
- De UK, Mukherjee R.** 2013. Dynamics of milk leukocytes in response to a biological response modifier during bovine subclinical mastitis. *Res Vet Sci.* 95:352-357.
- De Vlieghe S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW.** 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.* 95:1025-1040.
- Della Libera AMMP, Souza FN, Batista CF, Santos BP, Azevedo LFF, Sanchez EMR, Diniz SA, Silva MX, Haddad JP, Blagitz MG.** 2015. Effect of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Vet Res.* 46:2.
- Dellmann HD.** 1994. *Histología Veterinaria. Segunda Edición.* Zaragoza, España. 323-353.
- Denis M, Parlane NA, Lacy-Hulbert SJ, Summers EL, Buddle BM, Wedlock DN.** 2006. Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 114:111-120.
- Desiderio JV, Campbell SG.** 1980. Bovine mammary gland macrophage: isolation, morphologic features, and cytophilic immunoglobulins. *Am J Vet Res.* 41:1595-1599.

- Dewdney JM**, Maes L, Raynaud JP, Blanc F, Scheid JP, Jackson T, Lens S, Verschueren C. 1991. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immunoallergic potential. *Food Chem Toxicol.* 29:477-483.
- Di Gioia M, Zanoni I.** 2015. Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. *Mol Immunol.* 63:143-152.
- Di Giovine FS**, Symons JA, Duff GW. 1991. Kinetics of IL-1 $\beta$  mRNA and protein accumulation in human mononuclear cells. *Immunol Lett.* 29:211-218.
- Díaz-murillo V**, Medina-estrada I, López-meza JE, Ochoa-zarzosa, A. 2016. Peptides Defensin thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides.* 78:109-118.
- Dieser SA**, Vissio C, Lasagno MC, Bogni CI, Larriestra AJ, Odierno LM. 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentine an dairy herds. *Pak Vet J.* 34: 124-126.
- Dinarello CA.** 1994. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw.* 5:5175-5131.
- Dinarello CA.** 2007. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 37:34-45.
- Ding LW.** 2010. Investigation of ginseng markets. *Mod Chin Med.* 12:44-8.
- Dingwell RT**, Kelton DF, Leslie KE. 2003a. Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19:235-265.
- Dingwell RT**, Leslie TE, Duffield TF, Schukken YH, Des Coteaux L, Keefe GP, Bagg R. 2003b. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. *J Dairy Sci.* 86:159-168.

- Djabri B**, Barielle N, Beaudeau F, Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a metaanalysis. *Vet Res.* 33:335-357.
- Donlan RM, Costerton JW.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15: 167-193.
- Dos Santos Nascimento J**, Dos Santos KR, Gentilini E, Sordelli D, De Freire Bastos Mdo C. 2002. Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 85:133-44.
- Dosogne H**, Vangroenweghe F, Barrio B, Rainard P, Burvenich C. 2001. Decreased number and bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* of the resident cells in milk of dairy cows during early lactation. *J Dairy Res.* 68:539-549.
- Duke J.** 2000. *The Green Pharmacy Herbal Handbook: Your Comprehensive Reference to the Best Herbs for Healing.* Rodale. 3.
- Dybdahl B**, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A. 2002. Inflammatory response of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 195:99-111.
- Dziewanowska K**, Carson AR, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Bohach GA. 2000. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect Immun.* 68:6321-6328.
- Eberhart RJ.** 1986. Management of dry cow to reduce mastitis. *J Dairy Sci.* 69:1721-1732.
- Edinger D**, Tenhagen BA, Kalbe P, Klünder G, Baumgärtner B, Heuwieser W. 2000. Effect of teat dipping with a germicide barrier teat dip in late gestation on intramammary infection and clinical mastitis during the first 5 days post-partum in primiparous cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 8:463-8.

- Edmondson P.** 2016. Clinical forum: selective dry cow therapy. *Livestock.* 21:142-151.
- Elazar S,** Gonen E, Livneh-Kol A, Rosenshine I, Shpigel NY. 2010. Neutrophil recruitment in endotoxin induced murine mastitis is strictly dependent on mammary alveolar macrophages. *Vet Res.* 41:10.
- Ellington JK,** Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. 1999. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog.* 26:317-323.
- Erskine R.** 2004. Philosophical approach to antibiotic therapy: know the cow, bug and drug. Proc. 43rd Annual Meeting National Mastitis Council. 8-11.
- Esen N,** Tanga FY, Deleo JA, Kielian T. 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *J Neurochem.* 88:746-758.
- Faimboim L,** Geffner J. 2008. Introducción a la inmunología humana. 5ta. Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 51-88.
- Felipe V.** 2016. Respuesta Inmunológica e Interacción Microbiana en Glándula Mamaria Bovina (*Bos taurus*) Efecto del Polisacárido Quitosano. Tesis doctoral Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Fernández Botran R,** Chilton PM, Ma Y. 1996. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy. *Adv Immunol.* 63:269-336.
- Fey PD,** Olson ME. 2010. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Fut Microbiol.* 5:917-933.
- Finlay BB,** Cossart P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 5313:718-725.
- Fire A,** Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-811.

- Flemming HC, Wingender J.** 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 8:623.
- Foster TJ, Hook M.** 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:484- 488.
- Fox LK, McDonald JS, Hillers JK, Corbeil LB.** 1988. Function of phagocytes obtained from lacteal secretions of lactating and nonlactating cows. *Am J Vet Res.* 49:678-681.
- Fox LK, McDonald JS.** 1988. Functional activity of neutrophils from bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 71:3521-3534.
- Fu Y, Liu B, Zhang N, Liu Z, Liang D, Li F, Cao Y, Feng X, Zhang X, Yang Z.** 2013. Magnolol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by interfering with TLR4 mediated NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways. *J Ethnopharmacol.* 145:193-199.
- Gao XS.** 2000. Trial-explanation of the name “Renshen”. *J Chin Med Literat.* 1:22-23.
- Gao XJ, Wang TC, Zhang ZC, Cao YG, Zhang NS, Guo MY.** 2015. Brazilin plays an anti-inflammatory role with regulating Toll-like receptor 2 and TLR 2 downstream pathways in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Int Immunoph.* 27:130-137.
- Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, Renzoni A, Lucchini S, Lew DP, Vaudaux P, Kelley WL, Schrenzel J.** 2007. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics.* 8:171.
- Gasque Gómez R.** 2008. Enciclopedia Bovina. 2da Edición. Ed. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN: 978-970-32-4359-4. Capítulo 11.
- Ghosh S, Karin M.** 2002. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell.* 109:81-96.

- Gilbert FB**, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Rupp R, Rainard P. 2013. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res.* 44:40.
- Gillis CN.** 1997. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link. *Biochem Pharmacol.* 54:1-8.
- Goldsby RA.** 2003. Major histocompatibility complex. *Immunology.* 5th ed. W.H. Freeman. New York.
- Gomes F**, Saavedra MJ, Henriques M. 2016. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathog Dis.* 74:1-7.
- Gomes F, Henriques M.** 2016. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Curr Microbiol.* 72:377-382.
- González Pereyra V**, Pol M, Pastorino F, Herrero A. 2015. Quantification of antimicrobial usage in dairy cows and preweaned calves in Argentina. *Prev Vet Med.* 122:273-9.
- Gouwy M**, Struyf S, Proost P, Van Damme J. 2005. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth F R.* 16:561-580.
- Green MJ**, Green LE, Medley GF, Schukken YH, Bradley AJ. 2002. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 85:2589-99.
- Green MJ**, Bradley AJ, Medley GF, Browne WJ. 2007. Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving. *J Dairy Sci.* 90:3764-3776.
- Green MJ**, Huxley J, Madouasse A, Browne W, Medley G, Bradley A, Thorne M. 2008. Making good decisions on dry cow management to improve udder health. Synthesising evidence in a Bayesian framework. *Cattle Practice.* 16: 200-208.

- Gresham HD**, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol.* 164:3713–3722.
- Günther J**, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert HM. 2011. Comparative kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by IL-6 but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 79:695-707.
- Gupta RK**, Griffin P, Echenchang JR, Rivera R, Anderson R, Rots B, Cecchini P. 1995. The role of adjuvants and delivery systems in modulation of immune response to vaccines. In novel strategies in design and production of vaccines. 105-113.
- Gutiérrez-Barrosoa A**, Anaya-López JL, Lara-Záratea L, Loeza-Larab PD, López-Mezaa JE, Ochoa-Zarzosa A. 2008. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 121:113–122.
- Guzik TJ**, Korbut R, Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 54:469–487.
- Haggar A**, Hussain M, Lonnie H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI. 2003. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun.* 71:2310–2317.
- Halasa T**, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Quart.* 29:18–31.
- Halasa T**, Nielen M, Whist AC, Osteras O. 2009. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 2. Cure of existing intramammary infections. *J Dairy Sci.* 92: 3150–3157.

- Han H.** 2018. Identification of several key genes by microarray data analysis of bovine mammary gland epithelial cells challenged with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Gene*. 683:123-132.
- Harmon RJ.** 2001. Somatic cell counts: a primer. *Proc Natl Mastitis Coun.* 40th Annual Meeting. 3-9
- Harrison EM,** Paterson GK, Holden MTG, Larsen J, Stegger M, Larsen AR, Petersen A, Skov RL, Christensen JM, Zeuthen AB, Heltberg O, Harris SR, Zadoks RN, Parkhill J, Peacock SJ, Holmes MA. 2013. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med*. 5:509-515.
- Hart LA,** Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF. 1998. Activation and localization of transcription factor, NF- $\kappa$ B, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 158:1585-1592.
- Haveri M,** Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol*. 103:993-1000.
- Hayashi F,** Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature*. 410:1099-1103.
- Hayden M, Ghosh.** 2008. Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell*. 132:344-362.
- Hebert A,** Sayasith K, Sénechal S, Dubreuil P, Lagacé J. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett*. 193:57-62.
- Hemmi H,** Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo S, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. 2002. Small antiviral compounds activate

immune cells via TLR7 MyD88-dependent signalling pathway. *Nat Immunol.* 3:196-200.

**Hensen SM**, Pavicic MJ, Lohuis JA, de Hoog JA, Poutrel B. 2000. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J Dairy Sci.* 83:1966-1975.

**Hillerton JE**, Bramley AJ, Staker RT, McKinnon CH. 1995. Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. *J Dairy Res.* 62:39-50.

**Hillerton J**, Berry E. 2005. Treating mastitis in the cow a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol.* 98:250-1255.

**Ho LJ**, Juan TY, Chao P, Wu WL, Chang DM, Chang SY, Lai JH. 2004. Plant alkaloid tetrandrine downregulates I $\kappa$ B $\alpha$  kinases-I $\kappa$ B $\alpha$ -NF- $\kappa$ B signaling pathway in human peripheral blood T cell. *Br J Pharmacol.* 143:919-927.

**Hoffmann A**, Natoli G, Ghosh G. 2006. Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene.* 25:6706-6716.

**Hoffmann C**, Ohlsen K, Hauck CR. 2011. Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *Eur J Cell Biol.* 90:891-896.

**Hope JC**, Whelan AO, Hewinson RG, Vordermeier M, Howard CJ. 2003. Maturation of bovine dendritic cells by lipopeptides. *Vet Immunol Immunopathol.* 95:21-31.

**Hornef MW**, Wick MJ, Rhen M, Normark S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptative immune responses. *Nat Immunol.* 3:1033-1040.

**Hu S**, Concha C, Cooray R, Holmberg O. 1995. Ginseng enhanced oxidative and phagocytic activities of polymorphonuclear leucocytes from bovine peripheral blood and stripping milk. *Vet Res.* 26:155-161.

- Hu S**, Concha C, Jahannisson A, Meglia G, Waller KP. 2001. Effect of subcutaneous injection of Ginseng on cows with subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. J Vet Med. 48:519-528.
- Hu S**. 2002. Immunomodulatory and adjuvant effects of ginseng extracts. Doctoral thesis. Swedish University Agricultural Sciences. Uppsala.
- Hu S**, Concha C, Lin F, Waller KP. 2003. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. Vet Immunol Immunopathol. 91:29-37.
- Huxley JN**, Greent MJ, Green LE, Bradley AJ. 2002. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. J Dairy Sci. 85:551-561.
- Hyunh HT**, Robitaille G, Turner JD. 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An in vivo model for bovine lactation. Exp Cell Res. 197:191-199.
- Ibeagha-Awemu EM**, Lee JW, Ibeagha AE, Bannerman DD, Paape MJ, Zhao X. 2008. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. Vet Res. 39:11.
- Inchaisri C**, Persson-Waller K, Jahannisson A. 2000. Studies on the modulation of leukocytes subpopulations and immunoglobulins following intramammary infusion of B 1,3-glucan into the bovine udder during the dry period. J Vet Med B. 47:373-386.
- Isberg RR**, Leong JM. 1990. Multiple  $\beta 1$  chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. Cell. 60:861-871.
- Jamali H**, Barkema HW, Jacques M, Lavallée-Bourget EM, Malouin F, Saini V, Stryhn H, Dufour S. 2018. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. J Dairy Sci. 101:4729-4746.
- Jensen K**, Anderson JA, Glass EJ. 2014. Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by

- transfection and electroporation. *Vet immunol and immunopathol.* 158:224-232.
- Jia L, Zhao YQ.** 2009. Current evaluation of the millennium phytomedicine ginseng: etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations. *Curr Med Chem.* 16:2475-84.
- Jiao L, Wan D, Zhang X, Li B, Zhao H, Liu S.** 2012. Characterization and immunostimulating effects on murine peritoneal macrophages of oligosaccharide isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J Ethnopharmacol.* 144:490-496.
- Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL.** 2002. Receptor mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 168:5233-5239.
- Kaithwas G, Mukerjee A, Kumar P, Majumdar DK.** 2011. *Linum usitatissimum* (linseed/flaxseed) fixed oil: antimicrobial activity and efficacy in bovine mastitis. *Inflammopharmacol.* 19:45-52.
- Kang S, Min H.** 2012. Ginseng, the 'Immunity Boost': The effects of *Panax ginseng* on immune system. *J Ginseng Res.* 36:354-368.
- Karin M, Ben-Neriah Y.** 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol.* 18:621-663.
- Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M, Najjuka CF, Joloba ML.** 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around kampala, Uganda. *Plos one.* 8:1-12.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S.** 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 11:115-122.
- Kawai T, Akira S.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immune: update on Toll-like receptor. *Nature Immunol.* 11:373-384.

- Keane OM**, Budd KE, Flynn J, McCoy F. 2013. Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex aetiology. *Vet Rec.* 173:17.
- Keller ET**, Wanagat J, Ershler WB. 2006. Molecular and cellular biology of IL-6 and its receptor. *Front Biosci.* 1:340-357.
- Kerro Dego O**, **Van Dijk J**. 2002. Nederbragt factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Q H.* 24:181-198.
- Khachatryan A**, Besser T, Dale H, Hancock D, Call DR. 2006. Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of Streptomycin-Sulfa-Tetracycline-Resistant *Escherichia coli* on a Dairy Farm. *App Environ Microbiol.* 72:4583-4588.
- Khaled WT**, Read EK, Nicholson SE, Baxter FO, Brennan AJ, Came PJ, Sprigg NJ, McKenzie AN, Watson CJ. 2007. The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development.* 134:2739-2750.
- Kiedrowski MR**, **Horswill AR**. 2011. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci.* 124:104-121.
- Kim MK**, Lee JW, Lee KY, Yang DC. 2005. Microbial conversion of major ginsenoside Rb1 to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd. *J Microbiol* 43:456-462.
- Koess C**, **Hamann J**. 2008. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J Dairy Res.* 75:225-232.
- Kools SAE**, Moltmann JF, Knacker T. 2008. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regul Toxicol Pharmacol.* 50:59-65.
- Krömker V**, **Leimbach S**. 2017. Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 3:21-29.

- Kuhn MT**, Hutchinson JL, Norman HD. 2005. Minimum days dry to maximize milk yield in subsequent lactation. *Anim Res.* 54:351-367.
- Kumar A**, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. 2004. NF- $\kappa$ B: its role in health and disease. *J Mol Med.* 82:434-448.
- Kumar H**, Kawai T, Akira S. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 388:621-625.
- Kuttila T**, Pyörälä S, Kaartinen L, Isomäki R, Vahtola K, Myllykoski L, Saloniemi H. 2003. Lactoferrin and citrate concentrations at drying-off and during early mammary involution of dairy cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 50:350-353.
- Kwong KY**, Literat A, Zhu NL, Huang HH, Li C, Jones CA, Minoos P. 2004. Expression of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ 1) in human epithelial alveolar cells: A pro-inflammatory mediator independent pathway. *Life Sci.* 74:2941-2957.
- Lahouassa H**, Moussay E, Pascal R, Riollot C. 2007. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine.* 38:12-21.
- Lanctôt S**, Fustier P, Taherian AR, Bisakowski B, Zhao X, Lacasse P. 2017. Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution. *J Dairy Sci.* 100:2269-2281.
- Lara-Zárate L**, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. 2011. *Staphylococcus aureus* inhibits NF- $\kappa$ B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 1:313-318.
- Lee CS**, McDowell GH, Lascelles AK. 1969. The importance of macrophages in the removal of fat from the involuting mammary gland. *Res Vet Sci.* 10:34-38.
- Lee CS**, Wooding FB, Kemp P. 1980. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretion, colostrum and milk from normal cows. *J Dairy Res.* 47:39-50.

- Lee CS, Outteridge PM.** 1981. Leucocytes of sheep colostrum, milk and involution secretion, with particular reference to ultrastructure and lymphocyte sub-populations. *J. Dairy Res.* 48:225–237.
- Lee CS, McCauley I, Hartman PE.** 1983. Light and electron microscopy of cells in pig colostrum, milk and involution secretion. *Acta Anat.* 117:270–280.
- Lee JY, Hwang DH.** 2006. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors. *Mol Cell.* 21.
- Lee SJ, Chinen J, Kavanaugh A.** 2010. Immunomodulator therapy: monoclonal antibodies, fusion proteins, cytokines, and immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 125:314-23.
- Lee NH, Yoo SR, Kim HG, Cho JH, Sn CG.** 2012. Safety and tolerability of *Panax ginseng* root extract: a randomized, placebo-controlled, clinical trial in healthy Korean volunteers. *J Altern Complement Med.* 11:1061- 1069.
- Leelahapongsathon K, Piroon T, Chaisri W, Suriyasathaporn W.** 2016. Factors in dry period associated with intramammary infection and subsequent clinical mastitis in early postpartum Cows. *Asian-Australas J Anim Sci.* 29: 580–585.
- Leitner G, Shoshani E, Krifucks O, Chaffer M, Saran A.** 2000. Milk leukocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J Vet Med Ser B.* 47:581-589.
- Leitner G, Pinchasov Y, Morag E, Spanier Y, Jacoby S, Eliau D, Pitcovski J.** 2013. Immunotherapy of mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 153:209-216.
- Livak K, Schmittgen T.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT Method. *Methods.* 25:402-408.
- Makovec JA, PL Ruegg.** 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci.* 86:3466–3472.

- Massague J, Gomis RR.** 2006. The logic of TGF- $\beta$  signaling. *FEBS Lett.* 580:2811-2820.
- Maxymiv NG, Bharathan M, Mullarky IK.** 2012. Bovine mammary dendritic cells: A heterogeneous population, distinct from macrophages and similar in phenotype to afferent lymph veiled cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 35:31-38.
- Mc Guire K, Jones M, Werling D, Williams JL, Glass EJ, Jann O.** 2006. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine toll-like receptors. *Anim Genet.* 37:47-50.
- McCurdy JD, Olynch TJ, Maher LH, Marshall JS.** 2003. Cutting edge: distinct toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol.* 170:1625-1629.
- Medzhitov R, Janeway C.** 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 173:89-97.
- Medzhitov R.** 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449:819-826.
- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J.** 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infection. *Vet J.* 171:398-407.
- Mémet S.** 2006. NF- $\kappa$ B functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol.* 72:1180-1195.
- Merle R, Schröder A, Hamann J.** 2007. Cell function in bovine mammary gland: a preliminary study on the interdependence of healthy and infected udder quarters. *J Dairy Res.* 74 174-179.
- Miles AA, Misra SS, Irwin JO.** 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond).* 38:732-749.
- Miller RH, Paape MJ, Fulton LA.** 1991. Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. *J Dairy Sci.* 74 3782-3790.

- Mitchell JM**, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: Causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J Food Prot.* 61:742-756.
- Monks J**, Rosner D, Geske FJ, Lehman L, Hanson L, Neville MC, Fadok VA. 2005. Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ.* 12:107-114.
- Monks J**, Smith-Steinhart C, Kruk ER, Fadok VA, Henson M. 2008. Epithelial cells remove apoptotic epithelial cells during post-lactation involution of the mouse mammary gland. *Biol Reprod.* 78:586-594.
- Montforts MHMM**. 2005. Validation of the EU Risk Assessment for Veterinary Medicines. Thesis PhD. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Leiden University, Netherlands.
- Moon JS**, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC. 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci.* 90:1176-1185.
- Morelli AB**, Becher D, Koernig S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E. 2012. Review ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases. *J Med Microbiol.* 61:935-943.
- Mukherjee R**. 2009. Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk cells in response to *Azadirachta indica* during bovine mastitis. *Trop Anim Health Prod.* 41:189-197.
- Mullen KAE**, Sparks LG, Lyman RL, Washburn SP, Anderson KL. 2013. Comparisons of milk quality on North Carolina organic and conventional dairies. *J Dairy Sci.* 96:6753-6762.

- Murai M**, Usui A, Seki K, Sakurada J, Masuda S. 1992. Intracellular localization of *Staphylococcus aureus* within primary cultured mouse kidney cells. *Microbiol Immunol.* 36:431-443.
- Murray P**, Rosenthal K, Pfäuer M. 2005. *Microbiología Médica*. Elsevier Inc. Madrid. 3:11-24.
- Myllys V**, Asplund K, Brofeldt E, Hirvelä-Koski V, Honkanen-Buzalski T, Junttila J, Kulkas L, Myllykangas O, Niskanen M, Saloniemi H, Sandholm M, Saranpää T . 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet Scand.* 39:119-126.
- Nagele V**, Heesemann J, Schielke S, Jimenez-Soto LF, Kurzai O, Ackermann N. 2011. *Neisseria meningitidis* adhesin NadA targets  $\beta$ 1 integrins: functional similarity to *Yersinia* invasion. *J Biol Chem.* 286:20546.
- Nakaya TA**, Kita M, Kuriyama H, Iwakura Y, Imanishi J. 2004. *Panax ginseng* induces production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor. *J Interferon Cytokine Res.* 24:93-100.
- Naranjo TW**, Lopera D, Elena L. 2016. Infection. Asociación Colombiana de Infectología Inmunoterapia con agentes biológicos e infecciones fúngicas: riesgos y beneficios. 73-81.
- Netea MG**, Quintin J, Van der Meer JW. 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe.* 9:355-61.
- Netea MG**, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LAJ, Xavier RJ. 2017. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 352:1-23.
- Neu M**, Vassallo K, Questa G, Bearzi C, Pol M, Herrero MA. 2009. Quantification of antimicrobial use on dairy farms in Buenos Aires province. In Proceedings of JICAL III. Terceras Jornadas Internacionales de Calidad de Leche. Buenos Aires, Argentina. 246-247.
- Nickerson SC**. 1989. Immunological aspects of mammary involution. *J Dairy Sci.* 72:1665-1678.

- Nickerson SC, Owens WE, Watts JL.** 1989. Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 72:3286-94.
- Nickerson SC, Sordillo LM.** 2017. Modulation of the bovine mammary gland. American Dairy Science Association. *Large Dairy Herd Management*, 3<sup>rd</sup> ed. 907-920.
- North R.J.** 1978. The concept of the activated macrophage. *J Immunol.* 121:809-813.
- O'Brien B, Fitzpatrick C, Meaney W.J, Joyce P.** 1999. Relationship between somatic cell count and neutrophils in milk. *Irish J Agric Food Res.* 38:288-296.
- O'Hagan DT.** 2015. New generation vaccine adjuvants. *ELS 2015:eLS.1-7.*
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J.** 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 276:10229-10233.
- Oliver SP, Smith KL.** 1982. Nonantibiotic approach in control of bovine mastitis during dry period. *J Dairy Sci.* 65:2119-2124.
- Oliver SP, Mitchell BA.** 1983. Susceptibility of bovine mammary glands to infections during the dry period. *J Dairy Sci.* 66:1162-1166.
- Oliver SP, Sordillo LM.** 1988. Udder health in the periparturient period. *J Dairy Sci.* 71:2584-2606.
- Oliver SP, Sordillo LM.** 1989. Approaches to the manipulation of mammary involution. *J Dairy Sci.* 72:1647-1664.
- Oliver SP, Lewis TM, Lewis MJ, Dowlen HH, Maki JL.** 1990. Persistence of antibiotics in bovine mammary secretions following intramammary infusion at cessation of milking. *Prev Vet Med.* 9:301-311.

- Oliver SP**, Lewis MJ, Gillespie BE, Dowlen HH, Jaenicke EC, Roberts RK. 2003. Parturition antibiotic treatment of heifers: milk production, milk quality and economic benefit. *J Dairy Sci.* 86:1187–1193.
- Oviedo-Boyso J**, Barriga-Rivera JG, Valdez-Alarcon JJ, Bravo-Patino A, Carabez-Trejo A, Cajero-Juarez M. 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- $\kappa$ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$ . *Scand J Immunol.* 67:169–176.
- Owens WE**, Ray CH, Watts JL, Yancey RR. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 80:313–317.
- Paape M J**, Capuco AV. 1997. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *J Anim Sci.* 75:556–565.
- Pahissa A**. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Primera edición. ICG Marge, SL Ed. Barcelona, España.
- Panacci M**, Lucini V, Colleoni F, Martucci C, Grosso S, Sacerdote P, Scaglione F. 2006. *Panax ginseng* C.A. Mayer G115 modulates pro-inflammatory cytokine production in mice throughout the increase of macrophage toll-like receptor 4 expression during physical stress. *Brain Behav Immun.* 20:546-551.
- Pantoja JC**, Hulland C, Ruegg PL. 2009. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J Dairy Sci.* 92:139-148.
- Papadopoulos P**, Papadopoulos T, Angelidis AS, Boukouvala E, Zdragas A, Papa A, Hadjichristodoulou C, Sergelidis D. 2018. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiol.* 69:43–50.

- Park KM**, Kim YS, Jeong TC, Joe CE, Shin HJ, Lee YH, Nam KY, Park JD. 2001. Nitric oxide is involved in the immunomodulating activities of acidic polysaccharide from *Panax ginseng*. *Planta Med.* 67:122-126.
- Park BG**, Jung HJ, Cho YW, Lim HW, Lim CJ. 2013. Potentiation of antioxidative and anti-inflammatory properties of cultured wild ginseng root extract through probiotic fermentation. *J Pharm Pharmacol.* 65:457-464.
- Parsek MR**, Singh PK. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57:677-701.
- Paterson GK**, Morgan FJ, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA. 2014. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J Antimicrob Chemother.* 69:598-602.
- Peacock SJ**, Foster TJ, Cameron BJ, Berendt AR. 1999. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology.* 145:3477-3486.
- Pell JM**. 1995. Principles of immunomodulation. *Livest Prod Sci.* 42:122-133.
- Pereyra EAL**. 2015. Estudios *in vivo* e *in vitro* sobre aspectos de la interacción patógeno-hospedador a partir de cepas seleccionadas de *Staphylococcus aureus* procedentes de infecciones intramamarias en bovinos. Tesis doctoral Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.
- Pereyra EAL**, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russic R, Calvino LF, Diez C, Dallard BE. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol.* 183:69-77.
- Perkins ND**. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* 8:49-62.

- Persson Waller K.** 1997. Modulation of endotoxin induced inflammation in the bovine teat using antagonists/inhibitors to leukotrienes, platelet activating factor and interleukin-1b. *Vet Immunol Immunopathol.* 57:239-251.
- Persson Waller K, Colditz IG.** 1999. The effect of experimental infectious mastitis on leukocyte subpopulations and cytokine production in non-lactating ewes. *J Vet Med.* 46:289-299.
- Persson Waller K, Colditz IG, Lun S, Ostensson K.** 2003. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin induced bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 74:31-36.
- Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK, Urth T, Sorum M, Schouls L, Larsen J, Skov R, Larsen AR.** 2013. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin Microbiol Infect.* 19:16-22.
- Peton V, Le Loir Y.** 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol.* 21:602-615.
- Petrovski KR, Trajcev M, Buneski G.** 2006. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *J South Afr Vet Assoc.* 77:52-60.
- Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:45.
- Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J.** 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother.* 53:28-52.
- Philpot WN, Nickerson SN.** 2000. Importancia económica de la mastitis. Ganando la lucha contra la mastitis. Westfalia-Surge. Estados Unidos de América. 1:44-53.

- Pieper J**, Hoedemaker M, Krömker V. 2013. Significance of the dry period for the development and prevention of new infections of the bovine mammary gland. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 41:315–324.
- Pinello KC**, Fonseca EDSM, Akisue G, Silva AP, Oloris SCS, Sakai M, Matsuzakia P, Nagamine MK, Neto JP, Dagli, MLZ. 2006. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. *Life Sci*. 78:1287–1292.
- Pitkala A**, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, Honkanen- Buzalski T. 2004. Bovine mastitis in Finland. Prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci*. 87:2433–2441.
- Pizarro-Cerda J**, Cossart P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 124:715–727.
- Pizarro-Cerda J**, Kuhbacher A, Cossart P. 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2:11.
- Prasad LB**, Newbould FH. 1968. Inoculation of the bovine teat duct with *Staphylococcus aureus*: the relationship of teat duct length, milk yield and milking rate to development of intramammary infection. *Can Vet J*. 9:107–115.
- Price JC**, Sheldon IM. 2013. Granulosa cells from emerged antral follicles of the bovine ovary initiate inflammation in response to bacterial pathogen-associated molecular patterns via Toll-like receptor pathways. *Biol reprod*. 89.
- Pumipuntu N**, Kulpeanprasit S, Santajit S, Tunyong W, Kong-Ngoen T, Hinthong W, Indrawattana N. 2017. Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. *Vet World*. 10:721-726.
- Pyörälä S**. 2009. Treatment of mastitis during lactation. *Ir Vet J*. 62:S40.

- Qu DF, Yu HJ, Liu Z, Zhang DF, Zhou QJ, Zhang HL, Du AF.** 2011. Ginsenoside Rg1 enhances immune response induced by recombinant toxoplasma gondii SAG1 antigen. *Vet Parasitol.* 179:28-34.
- Quinn PJ.** 1990. Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Adv Vet Sci Com Med.* 35:43-99.
- Quinn MT, Ammons MC, Deleo FR.** 2006. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin Sci.* 111:1-20.
- Rabiee AR, Lean IJ.** 2013. The effect of internal teat sealant products (Teatseal and Orbeseal) on intramammary infection, clinical mastitis, and somatic cell counts in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Dairy Sci.* 96:6915-6931.
- Radad K, Gille G, Liu L, Rausch WD.** 2006. Use of ginseng in medicine with emphasis on neurodegenerative disorders. *J Pharmacol Sci.* 100:175-186.
- Rainard P, Riollet C.** 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 37:369-400.
- Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M.** 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunol.* 30:23-32.
- Renna MS, Pereyra EA, Baravalle C, Camussone CM, Dallard BE, Marcipar IS, Calvino LF.** 2014. Functional role of antibodies generated in heifers through immunization with *Staphylococcus aureus* vaccines in invasion and phagocytosis assays. *FEMS Microbiol Lett.* 360:62-69.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B.** 2000a. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* 480:247-258.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B.** 2000b. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Diag Lab Immunol.* 7:161-167.

- Roberson JR**, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. 1998. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. J Dairy Sci. 81:687-693.
- Robert A**, Seegers H, Bareille N. 2006. Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows a quantitative analysis of published data. Vet Res. 37:25-48.
- Rodríguez-Franco DA**, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont Montfort G. 2005. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. Rev Lat Microb. 47:102-111
- Romero RAR**. 2014. Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el Laboratorio, 15. Retrieved from [http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis\\_bacteriana.pdf](http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf)
- Rossitto PV**, Ruiz L, Kikuchi Y, Glenn K, Ruiz K, Watts JL, Cullor JS. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococcus* isolated from bovine mastitis in central California dairies. J Dairy Sci. 85:132-138.
- Roussel P**, Cunha P, Porcherie A, Petzl W, Gilbert FB, Riollet C, Zerbe H, Rainard P, Germon P. 2015. Investigating the contribution of IL-17A and IL-17F to the host response during *Escherichia coli* mastitis. Vet Res. 1-14.
- Rouveix B**. 1997. Clinical pharmacology of cytokines. Proceeding of the Euroconference, Cytokines: Tools and Targets for Tomorrows Therapies. Institut Pasteur, France, 15-17 October.
- Ruegg PL**. 2010. Tratamiento de las mastitis clínicas: factores que influyen. Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. May 11-13, 2010 Avila, Spain.
- Ruegg PL**. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J Dairy Sci. 100:10381-10397.

- Rysanek D**, Zouharova M, Babak V. 2009. Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. *J Dairy Res.* 76:117-23.
- Sabroe I**, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK, Whyte MK. 2003. Selective roles for Toll-like receptor TLR2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol.* 170:5268-5275.
- Sanford CJ**, Keefe GP, Dohoo IR, Leslie KE, Dingwell RT, DesCôteaux L, Barkema HW. 2006. Efficacy of using an internal teat sealer to prevent new intramammary infections in nonlactating dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 228:1565-1573.
- Sankar P**. 2016. New therapeutic strategies to control and treatment of bovine mastitis. *Vet Med Open J.* 1:7-8.
- Sarikaya H**, Prgomet C, Pfaffl MW, Bruckmaier RM. 2004. Differentiation of leukocytes in bovine milk. *Milchwissenschaft.* 59:586-589.
- Sarikaya H**, Werner-Misof C, Atzkern M, Bruckmaier RM. 2005. Distribution of leukocyte populations, and milk composition, in milk fractions of healthy quarters in dairy cows. *J Dairy Res.* 72:486-492.
- Sarikaya H**, Schlamberger G, Bruckmaier RM. 2006. Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different levels in dairy cows. *J Dairy Sci.* 89:2479-2486.
- Sarmah AK**, Meyer MT, Boxall ABA. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosp.* 65:725-759.
- Sawa MB**, Wojciech N. 2012. Dry period length and performance of cows in the subsequent production cycle. *Archiv Tierzucht.* 2:140-147.
- Schukken YH**, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM. 2011. Host-response patterns of

- intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 144:270-89.
- Serhan CN, Savill J.** 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 6:1191-1197.
- Se-Young O, Mead PJ, Sharma BS, Quinton VM, Boermans HJ, Smith TK, Swamy HVLN, Karrow NA.** 2015. Toxicology in vitro effect of *Penicillium* mycotoxins on the cytokine gene expression, reactive oxygen species production and phagocytosis of bovine macrophage (BoMacs) function. *TIV* 30:446-453.
- Shephard RW, Burman S, Marcun P.** 2004. A comparative field trial of cephalonium and cloxacillin for dry cow therapy for mastitis in Australian dairy cows. *Aust Vet J.* 82:624-9.
- Shin JY, Song YJ, Yun YS, Yang HO, Rhee DK, Pyo S.** 2002. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 24:469-482.
- Shuster DE, Kehrl ME, Stevens MG.** 1993. Cytokine production during endotoxin induced mastitis in lactating dairy cows. *Am J Vet Res.* 54:80-87.
- Sidhu J, Gibbs RA, Ho GE, Unkovich I.** 2001. The role of indigenous microorganisms in suppression of *Salmonella* regrowth in composted biosolids. *Water Res.* 35:913-920.
- Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A.** 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with betalactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob. Agents Ch.* 46: 2797-2803.
- Signorini ML, Canavesio VR, Neder VE, Molineri AI, Vitulich CA, Tarabla HD, Calvino LF.** 2008. Valores predictivos y sensibilidad a nivel de rodeo de mastitis a partir de las características de las pruebas diagnósticas individuales y el tamaño del muestreo. *Rev InVet.* 8:91-102.

- Silvestrini P**, Beccaria C, Pereyra EAL, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE, Baravalle C. 2017. Intramammary inoculation of *Panax ginseng* plays an immunoprotective role in *Staphylococcus aureus* infection in a murine model. Res Vet Sci. 115:211-220.
- Sinha B**, Francois PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH. 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha_5\beta_1$ . Cell Microbiol. 1:101-117.
- Sinha B, Herrmann M**. 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. Thromb Haemost. 94:266-277.
- Sinha B, Fraunholz M**. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. Int J Med Microbiol. 300:170-175.
- Smiley ST**, King JA, Hancock WW. 2001. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. J Immunol. 167:2887-2894.
- Smith KL, Schanbacher FL**. 1977. Lactoferrin as a factor of resistance to infection of the bovine mammary gland. J Am Vet Med Assoc. 170:1224-1227.
- Smith KL, Hogan JS**. 1982. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. 21st Annu Mtg Natl Mastitis Counc. Inc. 87-93.
- Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS**. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J Dairy Sci. 68:1531-1553.
- Smith A**. 1988. Interleukin-2: inception, impact and implications. Science. 240:1169.
- Smith KL, Hogan JS**. 1993. Environmental mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 9:489-498.

- Smith KL, Hogan JS.** 1997. Risk factors for environmental streptococcal intramammary infections. Proc. Symp. Ontario Veterinary College, Canada. 2:42-50.
- Smulski S, Kaczmarowski ME, Lassa H.** 2011. Occurrence, forms and etiologic agents of mastitis in Poland depending on size of farm. Med Weteryn J. 67:190-193.
- Sol J, Sampimon OC, Barkema HW, Schukken YH.** 2000. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci. 83:278-284.
- Solomon KA, Pesti N, Wu G, Newton RC.** 1999. Cutting edge: a dominant negative form of TNF- $\alpha$  converting enzyme inhibits TNF and TNFRII secretion. J Immunol. 63:4105-4108.
- Song X, Hu S.** 2009. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. Vaccine. 27:4883-4890.
- Sordillo LM, Nickerson SC.** 1988. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. Am J Vet Res. 49:1112-1120.
- Sordillo LM, Nickerson SC, Akers RM.** 1989. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function. J Dairy Sci. 72:228-244.
- Sordillo LM, Babiuk LA.** 1991. Modulation of mammary neutrophil function during the periparturient period following in vitro exposure to recombinant bovine inter-feron gamma. Vet Immunol Immunopathol. 27:393.
- Sordillo LM, Streicher KL.** 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J Mammary Gland Biol. 7:135-146.
- Sordillo LM.** 2018. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 34:507-523.

- Sorensen JT, Enevoldsen C.** 1991. Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. *J Dairy Sci.* 74:1277-1283.
- Steinman RM, Mellman I.** 2004. Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. *Science.* 305:197-200.
- Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, Van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT, Moore KJ.** 2010. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 11:155-161.
- Stites DP, Stogo JD, Fuderberg UH, Wule VJ.** 1985. *Inmunología Básica y Clínica.* Editorial Científico Técnica. Ciudad de La Habana. 200-250.
- Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R.** 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine.* 31:72-86.
- Su F, Yuan L, Zhang L, Hu S.** 2012. Ginsenosides Rg1 and Re act as adjuvant via TLR4 signaling pathway. *Vaccine.* 30:4106-4112.
- Su F, Xue Y, Wang Y, Zhang L, Chen W, Hu S.** 2015. Protective effect of ginsenosides Rg1 and Re on LPS-induced sepsis by competitive binding to toll-like receptor 4. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:5654-5663.
- Sun J, Hu S, Song X.** 2007. Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine.* 25:1114-1120.
- Sun HX, Xie Y, Ye YP.** 2009. Advances in saponin based adjuvants. *Vaccine* 27:1787-1796.
- Sung WS, Lee DG.** 2008. The combination effect of Korean Red Ginseng saponins with kanamycin and cefotaxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull.* 31:1614-1617.

- Takahashi H**, Odai M, Mitani K, Inumaru S, Arai S, Horino R, Yokomizo Y. 2004. Effect of intramammary injection of rboGM-CSF on milk levels of chemiluminiscence activity, somatic cell count, and *Staphylococcus aureus* count in Holstein cows with *S. aureus* subclinical mastitis. Can J Vet Res. 68:182-187.
- Takahashi H**, Komatsu T, Hodate K, Horino R, Yokomizo Y. 2005. Effect of intramammary injection of Rb IL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminiscence activity and shedding patterns of total bacteria and *Staphylococcus aureus* in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis. J Vet Med B. 52:32-37.
- Takeda K, Akira S**. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol. 17:1-14.
- Takeuchi O**, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. 2000. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. Int Immunol. 12:113-117.
- Takx-Köhlen BC**. 1992. Immunomodulators. Future prospects. Pharm Weekbl Sci. 14:245-252.
- Tan BK, Vanitha J**. 2004. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: a review. Curr Med Chem 11:1423-1430.
- Taponen S**, Jantunen A, Pyorala E, Pyorala S. 2003. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Acta Vet Scand. 44:53-62.
- Taponen S**, Koort J, Björkroth J, Saloniemi H, Pyörälä S. 2007. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. J Dairy Sci. 90:3301-3307.

- Targowski SP, Niemialtowski M.** 1986 Appearance of Fc receptors on polymorphonuclear leukocytes after migration and their role in phagocytosis. *Infect Immun.* 52:798- 802.
- Tasheva, SM.** 2011. Estudio de la función de la vía NF- $\kappa$ B en las motoneuronas espinales y su relación con la atrofia muscular espinal. Tesis de doctorado. Universitat de Lleila.
- Tatarczuch LR, Bischof J, Philip CJ, Lee CS.** 2002. Phagocytic capacity of leucocytes in sheep mammary secretions following weaning. *J Anat.* 201:351-361.
- Tellez-Perez AD, Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE.** 2012. Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Vet Microbiol.* 160:91-98.
- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W.** 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 89:2542-2551.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T.** 2002. Oligosaccharides as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem.* 277:15107-15112.
- Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard B.A.** 2014. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Front Immunol.* 5:493.
- Tollersrud T, Kenny K, Reitz A, Lee J.** 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolated of *Staphylococcus aureus* and others *Staphylococcus* pp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol.* 38:2998-3003.
- Trevisi E, Zecconi A, Cogrossi S, Razzuoli E, Grossi P, Amadori M.** 2014. Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. *R Vet Sci.* 96:229-233.

- Trouillet S**, Rasigade JP, Lhoste Y, Ferry T, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F. 2011. A novel flow cytometry based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods*. 86:145-149.
- Tuchscher L**, Bischoff M, Lattar SM, Llana NM, Pfortner H, Niemann S, Geraci J, Van de Vyver H, Fraunholz MJ, Cheung AL, Herrmann M, Völker U, Sordelli DO, Peters G, y Löffler B. 2015. Sigma Factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic infections. *PLoS Pathog*. 11:1004870.
- Turner ML**, Cronin JG, Healey GD, Sheldon IM. 2014. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6. *Endocrinology*. 155:1453-1465.
- Turutoglu H**, Hasoksuz M, Ozturk D, Yildirim M, Sagnak S. 2009. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Vet Res Commun*. 33:945-956.
- Tzianabos AO**. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. *Clin Microbiol Rev*. 13:523-533.
- Usui A**, Murai M, Seki K, Sakurada J, Masuda S. 1992. Conspicuous ingestion of *Staphylococcus aureus* organisms by murine fibroblasts *in vitro*. *Microbiol Immunol*. 36:545-550.
- Vabulas RM**, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. 2002. HSP70 after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*. 105:685-690.
- Van Duijkeren E**, Hengeveld PD, Albers M, Pluister G, Jacobs P, Heres L, Van de Giessen AW. 2014. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. *Vet Microbiol*. 171:364-7.

- Van Putten JPM**, Duensing TD, Cole RL. 1998. Entry of OpaA+ gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors. *Molec Microbiol.* 29:369-379.
- Vandeputte-Van Messom G**, Burvenich C, Roets E, Devriese L, Haesebrouck F. 1995. Effects of *Staphylococcus aureus* mastitis after endotoxin application on milk yield and composition during subsequent lactation of Guinea pigs. *J Vet Med B.* 42:118-126.
- Vissio C**, Agüero DA, Raspanti CG, Odierno LM, Larriestra AJ. 2015. Productive and economic daily losses due to mastitis and its control expenditures in dairy farms in Córdoba, Argentina. *Arch Med Vet.* 47:7-14.
- Wang A**, Wang CZ, Wu JA, Osinski J, Yuan CS. 2005. Determination of major ginsenosides in *Panax quinquefolius* (American ginseng) using high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 16:272-277.
- Wang JH**, Zhang K, Wang N, Qiu XM, Wangetal YB. 2013. Involvement of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signalling pathway in beta1 integrin-mediated internalization of *Staphylococcus aureus* by alveolar epithelial cells. *J Microbiol.* 51:644-650.
- Wang MZ**, Gao FY, Zhang GD, Zhang SR. 1979. Analysis of ginseng. *Acta Pharmacol Sin.* 14:309-315.
- Watson CJ**. 2009. Immune cell regulators in mouse mammary development and involution. *J Anim Sci.* 87:35-42.
- Wedlock DN**, Doolin EE, Parlane N, Lacy-Hulbert S, Woolford MW. 2000. Effects of yeast expressed recombinant IL-2 and interferon on physiological changes in bovine mammary glands and on bactericidal activity of neutrophils. *J Dairy Res.* 67:189-197.
- Wei Z**, Fu Y, Zhou E, Tian Y, Yao M, Li Y, Yang Z, Cao Y. 2014a. Effects of niacin on *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by modulating NF- $\kappa$ B activation. *Microb Pathog.* 71-72:62-7.

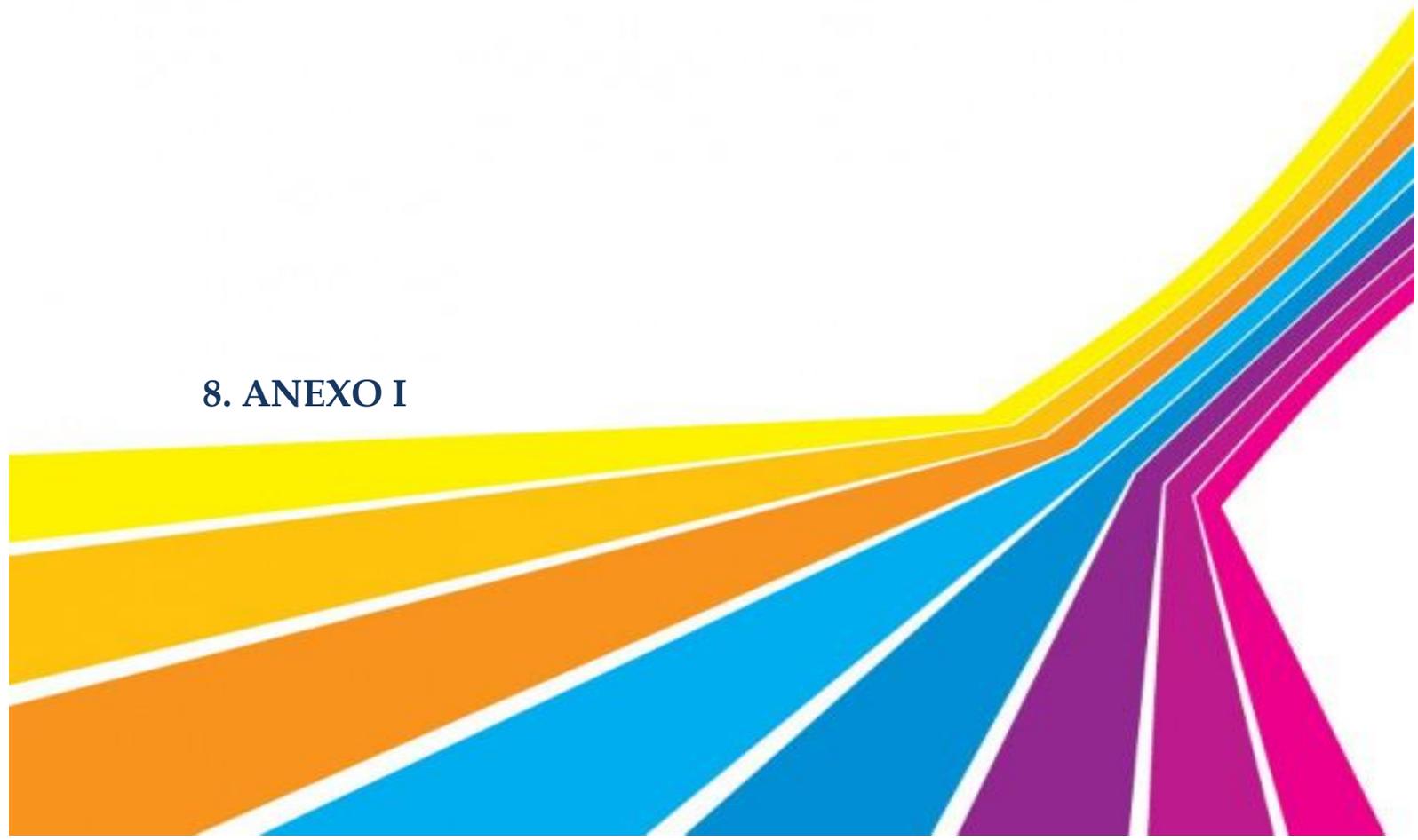
- Wei Z**, Zhou E, Guo C, Fu Y, Yu Y, Li Y, Yao M, Zhang N, Yang Z. 2014b. Thymol inhibits *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Microb Pathog.* 71-72:15-19.
- Wei Z**, Su K, Jiang P, Shi M, Wang J, Xie G. 2018. Geniposide reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Microb Pathog.* 125:443-447.
- Wellnitz O, Bruckmaier RM.** 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J.* 192:148-152.
- Werling D**, Piercy J, Coffey TJ. 2006. Expression of Toll-like receptors by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination. *Vet Immunol Immunopathol.* 112:2-11.
- Werling D**, Jann OC, Offord V, Glass EJ, Coffey TJ. 2009. Variation matters : TLR structure and species specific pathogen recognition. *Trends Immunol.* 30:124-130.
- Werling D**, Hope JC, Siddiqui N, Widdison S, Russell C, Sopp P, Coffey TJ. 2017. Subset-specific expression of Toll-like receptors by bovine afferent lymph dendritic cells. *Front Vet Sci.* 4:44.
- Whelehan CJ**, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O'Farrelly C. 2011. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region- specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol. Immunopathol.* 140:181-189.
- Whitfield LK, Laven RA.** 2017. A comparison of the effect of short acting and long-acting cloxacillin based dry cow therapy on somatic cell counts after calving in cows also given internal teat sealants. *N Z Vet J.* 66:44-47.
- Wickstrom E**, Persson-Waller K, Lindmark-Mansson H, Ostensson K, Sternesjo A. 2009. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. *J Dairy Res.* 76:195-201.

- Wilson NS, Yang B, Morelli AB, Koernig S, Yang A, Loeser S, Airey D, Provan L, Hass P, Braley H, Drane SCD, Boyle J, Belz GT, Ashkenazi A, Maraskovsky E.** 2011. ISCOMATRIX vaccines mediate CD8<sup>+</sup> T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway. *Immunol Cell Biol.* 90:540-52.
- Wolter W, Kloppert B.** 2004. Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. *Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina.* Guadalajara, Jalisco, México. 5.
- Wood PR, Rothel JS.** 1997. The IFN- $\gamma$  assay as a diagnostic test for bovine tuberculosis. Schijns, V.E.J., Horzinek, M.C. (Eds.). *Cytokines in Veterinary Medicine.* Cab International, New York, USA. 35-40.
- Wu H, Zhao G, Jiang K, Chen X, Zhu Z, Qiu C, Deng G.** 2016. Puerarin exerts an antiinflammatory effect by Inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK activation in *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Phytother Res.* 30:1658-1664.
- Xie X, Yang M, Liu HC, Zuo C, Li HJ, Fana JM.** 2009. Rg1 Ginsenoside, a major active component isolated from *Panax notoginseng*, restrains tubular epithelial to myofibroblast transition *in vitro*. *J Ethnopharmacol.* 122:35-41.
- Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K, Akira S.** 2004. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\beta$ . *Nature.* 430:218- 222.
- Yang YW, Shen SS.** 2007. Enhanced antigen delivery via cell death induced by the vaccine adjuvants. *Vaccine.* 25:7763-7772.
- Yang H, Zerbe W, Petzl RM, Brunner J, Günther C, Draing S, Von-Aulock HJ, Schuberth HJ, Seyfert HM.** 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- $\kappa$ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF $\alpha$

- and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol.* 45:1385–1397.
- Yang Z**, Fu Y, Liu B, Zhou E, Liu Z, Song X, Li D, Zhang N. 2013. Ferrerol regulates antimicrobial peptide expression and reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 65:1–6.
- Yang WC**, Hwang YS, Chen YY, Liu CL, Shen CN, Hong WH, Lo SM, Shen CR. 2017. Interleukin-4 Supports the suppressive immune responses elicited by regulatory T Cells. *Front Immunol.* 8:1508.
- Yuan D**, Yuan Q, Cui Q, Liu C, Zhou Z, Zhao H, Dun Y, Wang T, Zhang C. 2016. Vaccine adjuvant ginsenoside Rg1 enhances immune responses against hepatitis B surface antigen in mice. *Can J of physiol pharmacol.* 6:1–6.
- Zadoks RN**, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Gröhn YT, Schukken YH. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci.* 84:590-599.
- Zadoks RN.** 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine. 239:2-3.
- Zarzynska J**, Gajewska M, Motyl T. 2005. Effects of hormones and growth factors on TGF-beta1 expression in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Res.* 72:39-48.
- Zarzynska J**, **Motyl T.** 2008. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. *J Physiol Pharmacol.* 59:275–288.
- Zecconi A**, Bronzo V, Casula A, Luzzago C, Moroni P, Piccinini R, Spreafico G. 1999. Efficacy of a biological response modifier in preventing *Staphylococcus aureus* intramammary infections after calving. *J Dairy Sci.* 82:2101-2107.
- Zecconi A**, Calvinho LF, Fox KL. 2006a. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin.* 408:1-36.

- Zecconi A**, Cesaris L, Liandris E, Dapra V, Piccinini R. 2006b. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathog.* 40:177-183.
- Zetterlund A**, Larsson PH, Müller-Suur C, Palmberg L, Larsson K. 1998. Budesonide but not terbutaline decreases phagocytosis in alveolar macrophages. *Respir Med.* 92:162-166.
- Zhao BS**, Liu Y, Gao XY, Zhai HQ, Guo JY, Wang XY. 2014. Effects of Ginsenoside Rg1 on the Expression of Toll-Like Receptor 3, 4 and Their Signalling Transduction Factors in the NG108-15 Murine Neuroglial Cell Line. *Molecules* 2014. 19:16925-16936.
- Zhao X, Lacasse P.** 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci.* 86:57-65.
- Zhen YH**, Jin LJ, Li XY, Guo J, Li Z, Zhang BJ, Fang R, Xu YP. 2009. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 133:317-22.

## 8. ANEXO I



## MEDIOS DE CULTIVOS Y SOLUCIONES

### CULTIVO CELULAR

- **Medio MAC-T completo (200 ml finales):** 83 ml medio RPMI (Gibco BRL), 83 ml medio DMEM (Gibco BRL), 2 ml Piruvato Na<sup>+</sup>, 2 ml L-glutamina, 8 ml HEPES, 200 ul insulina, 250 ul hidrocortisona, 20 ml Suero fetal bovino, 2 ml antibiótico- antimicótico.
- **Medio RPMI completo (200 ml finales):** 176 ml RPMI (Gibco BRL), 20 ml Suero fetal bovino, 2 ml L-glutamina, 2 ml antibiótico- antimicótico.
- **Medio DMEM- RPMI 50/50 (100 ml finales):** 50 ml DMEM (Gibco BRL), 50 ml RPMI (Gibco BRL).
- **PBS 10X (1L):** 3,53 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), 25 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck x 2 H<sub>2</sub>O), 85 g NaCl (Cicarelli, Santa Fe, Argentina). Para PBS 1X diluir 1/10 esta preparación con agua Milli-Q estéril.

### ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- **TAE 1X:** 40 mm tris-acetato, 0,5 mm EDTA. pH 8,0.

### INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)

- **D-PBS:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,008 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,002 M, NaCl 0,14 M, KCl 0,01 M, llevar a 1 litro con agua Milli-Q estéril. pH: 7,4 filtrado.
- **Buffer carbonato- bicarbonato 0,2 M (250 ml finales):** 1,515 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 g NaHCO<sub>3</sub>, llevar a 250 ml con agua Milli-Q estéril. pH: 9,4.
- **Diluyente:** 4% Albúmina de suero bovino (BSA) en D-PBS. pH: 7,4 filtrado en 0,2 µm.
- **Solución de bloqueo:** 4% BSA y 5% sucrosa en D-PBS. Filtrado 0,2 µm.
- **Buffer de lavado:** 0,05% detergente Tween™ en D-PBS, pH: 7,4.

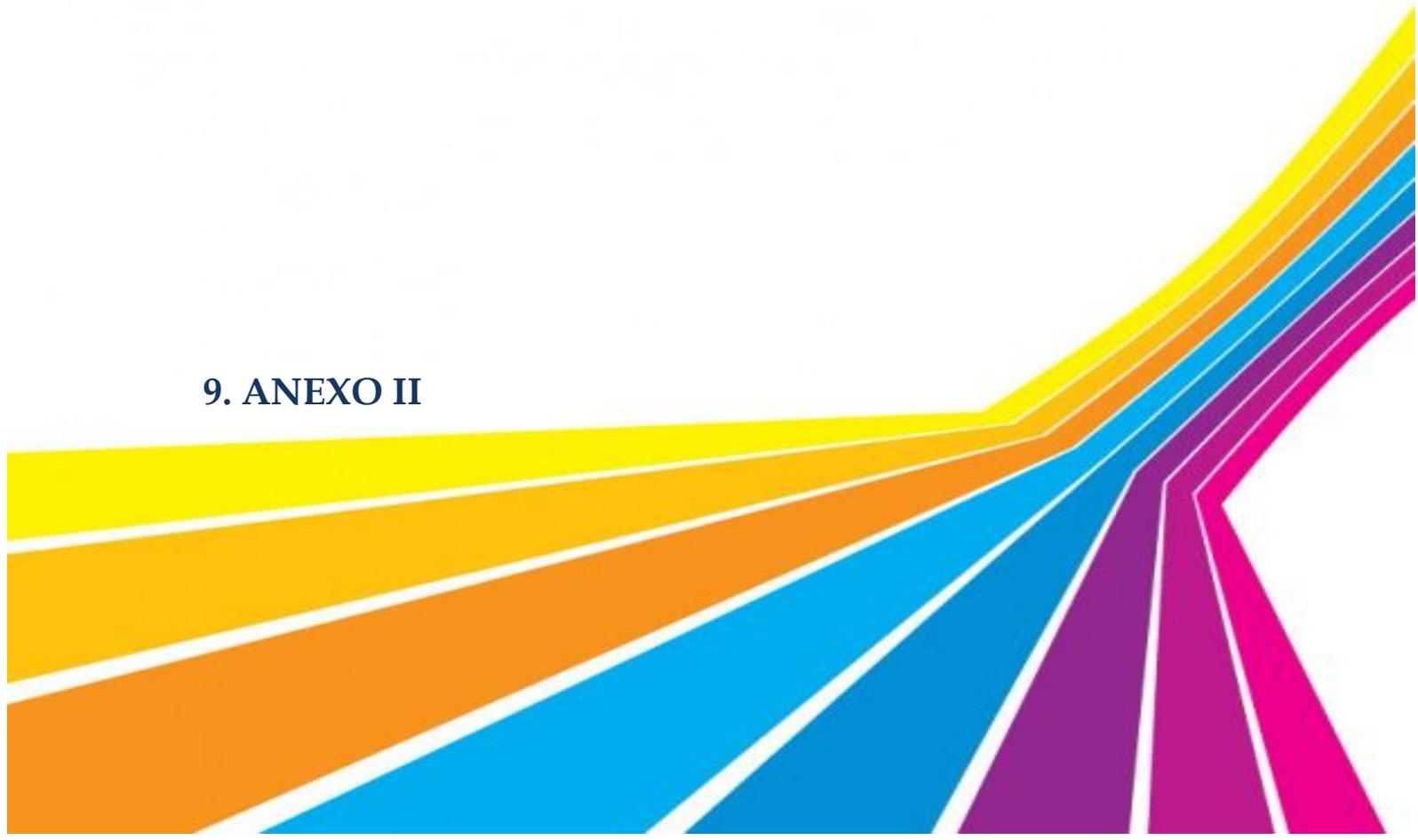
## MICROBIOLOGÍA

- **Agar base:** tripteína 1,5% P/V, peptona de soya 0,5% P/V, NaCl 0,5% P/V, agar 1,5% P/V (pH 7,3 ± 0,2). Se autoclavó a 121°C por 15 min.
- **Agar Manitol Salado (AMS):** extracto de carne 0,1% P/V, pluripeptona 1% P/V; d- manitol 1% P/V, NaCl 7,5% P/V, agar 1,5% P/V, rojo fenol 0,0025% P/V (pH 7,4 ± 0,2). Se autoclavó a 121°C por 15 min. Nota: si se pesa exacto no es necesario ajustar el pH del medio.
- **Agar sangre:** agar base se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Luego a los 55°C se le añadió sangre bovina 5% (v/v).
- **Tripteína soya caldo (TSC):** tripteína 1,7% P/V, peptona de soya 0,3% P/V, NaCl 0,5% P/V, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25% P/V, glucosa 0,25% P/V (pH 7,3 ± 0,2). Se esterilizó el medio a 121°C por 15 min.
- **Caldo Mueller Hinton (M-H):** infusión de carne 300 g/l; peptona ácida de caseína 17,5 g/l, almidón 1,5 g/l, pH final: 7,3 ± 0,1. Se autoclavó a 121°C por 15 min. Para modificar el pH se utilizó HCl 1N.

## CITOMETRÍA DE FLUJO

- **FACS (250 ml finales):** EDTA 5 mM, ácida sódica 0,1 g%, SFB 3% y PBS 1X hasta completar volumen.

## 9. ANEXO II



**PRUEBAS BÁSICAS Y COMPLEMENTARIAS PARA  
IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

**PRUEBAS Y MEDIOS DE CULTIVOS GENERALES**

❖ **TINCIÓN DE GRAM**

**Reactivos:**

Cristal Violeta 1%

Lugol: 10 g yodo en cristal, 20 g yoduro de potasio.

Decolorante: Alcohol-Acetona: 2 partes de alcohol 96°, 1 Acetona, safranina 1%.

**Procedimiento:**

1-Tomar un portaobjeto previamente desengrasado, colocar una gota de agua destilada estéril y suspender en ella contenido de la colonia bacteriana, dejar secar y fijar al calor 3 o 4 veces. Agregar cristal violeta por un minuto y lavar.

2-Adicionar lugol, dejar un minuto y lavar con agua.

3-Adicionar alcohol-acetona de cinco a treinta segundos y lavar.

4-Cubrir con safranina un minuto y lavar.

**Observación:** examinar al microscopio con objetivo de 100X con aceite de inmersión. Las bacterias Gram + se tiñen de azul. Las bacterias Gram - se tiñen de rojo.

❖ **PRUEBA DE CATALASA (MÉTODO DEL PORTA OBJETO)**

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa. Esta prueba permite distinguir el género *Staphylococcus*, catalasa (+) de otros géneros catalasa (-).

**Procedimiento:** se recogió el centro de una colonia pura de un cultivo en placa con una aguja de inoculación y se colocó en un portaobjeto de vidrio limpio. A continuación se agregó sobre las bacterias una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10%.

**Interpretación de los resultados:** prueba (+): formación inmediata de burbujas bien visibles por la liberación de O<sub>2</sub>. Prueba (-): no hay formación de burbujas (no se forma O<sub>2</sub>).

### PRUEBAS Y MEDIOS PARA *Staphylococcus*

#### ❖ PRUEBA DE COAGULASA (EN TUBO)

Esta prueba se basa en la capacidad de un microorganismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. La pared celular posee una proteína llamada coagulasa de unión, presente en *S. aureus*, la cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina.

**Procedimiento:** se colocaron 200 µl de plasma de conejo estéril en un tubo de hemólisis estéril. Se introdujeron de 2 a 3 colonias puras de un cultivo en placa y se resuspendió por agitación. Se incubó a 37°C y se observó coagulación a las 4, 8 y 24 horas.

#### **Interpretación de los resultados:**

Prueba (+): se forma un coágulo o filamentos de fibrina definidos que ocupa parcial o totalmente el volumen de plasma.

+1: pequeños coágulos.

+2: pequeños coágulos organizados.

+3: coágulos bien organizados.

+4: todo el cultivo coagulado. Al invertirlo no se vuelca ni se desplaza.

Prueba (-): no hay formación de coágulo, la suspensión se mantiene homogénea.

### PRUEBAS Y MEDIOS PARA *Streptococcus*

#### ❖ CRECIMIENTO EN CALDO CINa 6,5%

El crecimiento en este agar es característico de las bacterias tolerantes a la sal como los enterococos, los estreptococos no crecen en él. Picar la colonia en el agar CINA Incubar a 37 °C por 18–24 hs.

**Interpretación de los resultados: Reacción positiva:** cambia de color el medio de azul a amarillo, indicando tolerancia a la sal de los microorganismos.  
**Reacción negativa:** el agar mantiene el color azul.

#### ❖ HIDRÓLISIS DEL HIPURATO

*Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* son capaces de hidrolizar el hipurato. La hidrólisis del hipurato de sodio produce serina que es deaminada por la ninhydrina produciendo un producto coloreado púrpura.

**Procedimiento:** tomar una alícuota de 0,4 ml de hipurato de sodio al 1% y colocar en estufa a 37°C por 10 minutos. Con ansa ojal transferir 3–4 colonias al tubo y suspender. Mezclar con vórtex. Incubar a 37°C por 2 horas. Adicionar 2 gotas de solución de ninhydrina 3,5% en cada tubo. Incubar a 37°C por 10 minutos.

**Interpretación de los resultados:** observar los tubos por desarrollo de color. Púrpura = hipurato de sodio positivo. Sin cambio de color = hipurato de sodio negativo.

#### ❖ CAMP TEST

El medio utilizado consiste en agar sangre al 5% adicionado con 10% de esculina y 0,01% de citrato férrico.

**Procedimiento:** la realización de la prueba requiere de una cepa de *Staphylococcus aureus* hemolítica pura, la cual se siembra en el centro de la placa de norte a sur. Los estreptococos que se desea evaluar son sembrados perpendicularmente a la línea de inoculación del estafilococo sin tocar la estría vertical, aproximadamente a 2 o 3 mm de ésta. Se incuban a 37°C durante 18 a 24 hs.

**Interpretación de los resultados:** una reacción positiva intensifica la lisis y asume la forma de una cabeza de flecha en la intersección de ambas estrías. El oscurecimiento del medio alrededor del estreptococo corresponde a la separación de la esculina.

#### ❖ **HIDRÓLISIS DE LA ESCULINA**

Seleccionar colonias que sean cocos gram positivos y catalasa negativa provenientes de placas de agar sangre. Sembrar en caldo esculina. Incubar 24-48 hs a 37°C. **Reacción positiva:** formación de un pigmento negro en el caldo. **Reacción negativa:** no hay cambio de color en el caldo.

### **PRUEBAS Y MEDIOS PARA ORGANISMOS GRAM NEGATIVOS**

#### ❖ **AGAR TRIPLE AZÚCAR HIERRO**

**Composición:** agar en polvo triple azúcar hierro 65 g, agua destilada 1000 ml.

**Procedimiento:**

- 1 - Mezclar y calentar para disolver.
- 2 - Dispensar 5 ml por tubo (tubos tamaño 10 mm de diámetro).
- 3 - Autoclavar no más de 118°C por 15 minutos.
- 4 - Enfriar en posición inclinada dejando un fondo de tubo generoso.
- 5 - Almacenar refrigerado. Este medio se usa para diferenciar enterobacterias.

Las colonias sospechosas obtenidas se siembran con ansa recta por picadura en el fondo y por estría en el pico de flauta. Se incuba a 37°C durante 18 a 24 hs.

**Interpretación de los resultados:** a continuación se describen reacciones observadas en tubos inclinados de TSI.

<b>Aspecto</b>	<b>Reacciones</b>
Fondo ácido (amarillo), inclinado alcalino (rojo).	Fermentación de la glucosa.
Ácido en todo el medio: fondo e inclinados lactosa y/o amarillos.	Fermentación de glucosa, sacarosa.
Burbujas de gas en el fondo y medio agrietado.	Producción de gas.
Fondo mostrando ennegrecimiento.	Producción de ác. Sulfhídrico.
Fondo e inclinados alcalinos, rojo en todo el medio.	No fermento ninguno de los tres azúcares.

#### ❖ MEDIO SULFHÍDRICO INDOL MOTILIDAD (SIM)

Es un medio de cultivo de diferenciación, para probar la formación de sulfuro, la formación de indol y la movilidad, dentro del diagnóstico de las Enterobacterias. La diferenciación requiere cultivo puro que debe ser obtenido previamente mediante medios de cultivo selectivos.

**Procedimiento:** el cultivo se siembra con ansa aguja, por el procedimiento de picadura, en la capa superior del medio de cultivo solidificado. La incubación se efectúa a 37°C durante 18-24 hs.

**Interpretación de los resultados:** La **movilidad** se muestra por una turbidez difusa del medio de cultivo en los alrededores del canal de la picadura, mientras que un crecimiento sólo a lo largo del canal de la picadura indica inmovilidad. La formación de **sulfuro** se manifiesta por ennegrecimiento a lo largo del canal de la picadura o en la totalidad del medio de cultivo. La demostración de **indol** se practica al final de la lectura cubriendo el cultivo con reactivo de indol según Kovács. En caso de formación de **indol** se produce una coloración rojo-purpúrea del reactivo.