



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA). Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral, UNL-CONICET).

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

Estudio del potencial inmunomodulatorio y capacidad adyuvante del ginsenósido Rg1.

Autora: Paula Silvestrini.

Directora: Dra. Celina Baravalle.

Codirectora: Dra. Bibiana E. Dallard.

2020



Gracias...

Mami, Papi, Vico y Pachi por su incondicionalidad, por los infinitos abrazos y sonrisas...

Celi Baravalle por haber confiado en mí desde el primer momento. Gracias por tu esfuerzo y dedicación porque de lo contrario, esta tesis no hubiera sido posible. Gracias por tu paciencia, por guiarme, motivarme y no dejarme sola pero, sobre todo, gracias por el cariño que siempre me das...

Sol Renna por el tiempo y dedicación que me brindaste durante estos años, por tus aportes y compromiso con este trabajo. Gracias por enseñarme a ver los resultados con entusiasmo, pero más que nada, gracias por acompañarme y cuidarme tanto...

Bibi Dallard por ponerte al hombro los muestreos (míos y de todo el equipo) pero, fundamentalmente, por acompañarme en este proceso y ayudarme cada vez que te necesité...

Cami Beccaria por las miles de idas al tambo pero más importante, por todos los momentos que compartimos dentro y fuera del laboratorio. Gracias amiga por tantas risas y tantas birras...

Belu Peralta y Luquitas Etchevers, por estar siempre, siempre. Sin la compañía y apoyo de Uds. hubiera sido taaan difícil en algunos momentos...

Anto Stassi, Caro Engler, Cristi Leiva, Dai Barcarolo, Emma Angelli, Enzo Cabaña, Facu Salinas, Flor Olmos, Gonza Santiago, Juan Chiaraviglio, Lean Durante, Marito Poque, Mati Belotti, Mauri Kern, Nati Gareis, Nati Velázquez, Quique Rebelindo, Silvi Addona, Silvi Pirola, Sofi Cainelli, Sofi Sacco y Uli Notaro por tantos mates (pre-pandemia), charlas y ensayos compartidos, pero sobre todo, por hacer tan simple y divertido el “ir a trabajar”...

Andre Berengeno, Aye Amweg, Belkis Marelli, Fer Rodríguez, Eli Pereyra, Euge Baravalle, Flor Rey, Gustavo Hein, Marce Zayas, Meli Velázquez, Nati Salvatti, Pablito Díaz y Valen Matiller por estar siempre disponibles frente a cada consulta, por la confianza y el aliento que siempre me dieron...

Hugo Ortega por permitirme ser parte de este gran equipo de trabajo...

Luis Calvino por tus valiosos aportes en esta tesis...

Tatiana Scorza por abrirme las puertas del laboratorio y también de tu casa. Gracias por tu inmensa generosidad y aportes a esta tesis. Gracias por darme la posibilidad de vivir una experiencia que, indudablemente, me marcó...

A la Dra. Carolina Veaute y su equipo, por cedernos los liposomas para poder llevar a cabo gran parte de esta tesis...

A la Med. Vet. Ivana Cellone por conseguirnos desinteresadamente muestras de secreción y sangre para poder avanzar con este trabajo en tiempos de pandemia...



A la Dra. Andrea Racca y al Dr. Gabriel Cabrera por prestarme alícuotas de anticuerpos para realizar pruebas cuando se “quemaban los papeles”...

A la Dra. Ana Mollinari por la ayuda en las consultas estadísticas...

A la Facultad de Ciencias Veterinarias por brindarme la posibilidad de cursar mis estudios de posgrado, pero sobre todo, por las personas con que me cruzó...

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca que me permitió realizar el Doctorado en Ciencias Veterinarias...

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por otorgar los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de tesis...

A todos, infinitamente GRACIAS!!!

Índice

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | I |
| Índice de figuras. | IV |
| Índice de tablas..... | VII |
| Resumen..... | VIII |
| <i>Abstract</i> | IX |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Mastitis bovina. | 2 |
| 1.1.1. Generalidades..... | 2 |
| 1.1.2. Mastitis causada por <i>Staphylococcus aureus</i> | 3 |
| 1.1.3. Periodo de involución de la GM e IIM..... | 4 |
| 1.2. Mecanismos de defensa de la GM bovina. | 5 |
| 1.2.1. RI innata..... | 6 |
| 1.2.1.1. Barreras anatómicas. | 6 |
| 1.2.1.2. Defensas celulares. | 6 |
| 1.2.1.3. Defensas solubles. | 7 |
| 1.2.1.4. Interacción entre microorganismos patógenos y células del hospedador..... | 9 |
| 1.2.1.4.1. Receptores tipo <i>toll</i> | 9 |
| 1.2.1.4.2. Vías de señalización de los TLRs..... | 10 |
| 1.2.1.4.3. Mecanismos microbicidas efectores..... | 11 |
| 1.2.2. RI adaptativa..... | 12 |
| 1.3. Modulación de la RI. | 13 |
| 1.3.1. <i>Panax ginseng</i> como MRI..... | 14 |
| 1.3.2. Ginsenosídeos..... | 16 |
| 1.3.2.1. Antecedentes sobre las propiedades inmunoestimulantes del ginsenosido Rg1. ... | 17 |
| 1.3.2.2. Rg1 y mastitis..... | 18 |
| 1.3.3. Liposomas. | 19 |
| | |
| 2. OBJETIVOS..... | 20 |
| 2.1. Objetivo general. | 21 |
| 2.2. Objetivos específicos. | 21 |

| | |
|--|----|
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 3.1. Evaluación del potencial inmunomodulatorio de Rg1 en células bovinas <i>in vitro</i> | 23 |
| 3.1.1. Reactivos empleados. | 23 |
| 3.1.1.1. Ginsenosido Rg1. | 23 |
| 3.1.1.2. Cultivos celulares. | 23 |
| 3.1.1.2.1. Línea celular del epitelio alveolar mamario bovino. | 23 |
| 3.1.1.2.2. Células mononucleares aisladas de secreción mamaria bovina..... | 23 |
| 3.1.1.2.3. Cultivo primario de leucocitos totales aislados de sangre periférica bovina. | 24 |
| 3.1.2. Evaluación del efecto de Rg1 en la viabilidad de células bovinas mediante XTT. | 25 |
| 3.1.3. Evaluación del efecto de Rg1 en la expresión génica de componentes de la inmunidad innata en células MAC-T y MSMC mediante PCR en tiempo real. | 26 |
| 3.1.3.1. Diseño experimental..... | 26 |
| 3.1.3.2. Extracción de ARN..... | 26 |
| 3.1.3.3. Obtención de ADN copia mediante RT. | 26 |
| 3.1.3.4. Diseño de cebadores específicos para TLR2, TLR4, NFκB, IL-1β, IL-6, TNFα e IL-8 bovinos. | 27 |
| 3.1.3.5. Reacción de qPCR. | 28 |
| 3.1.4. Evaluación del efecto de Rg1 en la expresión proteica de TLR2 y TLR4 en MSMC y PBMC mediante citometría de flujo (CF)..... | 30 |
| 3.1.4.1. Diseño experimental..... | 30 |
| 3.1.4.2. Estrategia de selección de las poblaciones de interés. | 30 |
| 3.1.5. Evaluación del efecto de Rg1 en la producción intracelular de ROS en MSCM y PBMC mediante CF..... | 31 |
| 3.1.5.1. Caracterización y cultivo de la cepa 5011 de <i>S. aureus</i> | 31 |
| 3.1.5.2. Marcación de la cepa 5011 de <i>S. aureus</i> con FITC. | 32 |
| 3.1.5.3. Ensayo de fagocitosis de <i>S. aureus</i> por MSMC y PBMC y determinación de la producción de ROS. | 32 |
| 3.1.5.4. Estrategia de <i>gating</i> | 33 |
| 3.1.6. Evaluación del efecto de Rg1 en la expresión de CMH-II y CD80 en MSCM y PBMC mediante CF..... | 34 |
| 3.1.6.1. Diseño experimental..... | 34 |
| 3.1.6.2. Estrategia de <i>gating</i> | 34 |
| 3.1.7. Análisis estadístico..... | 35 |
| 3.2. Evaluación de la capacidad adyuvante de Rg1 en un modelo murino <i>in vivo</i> | 36 |
| 3.2.1. Reactivos y formulaciones empleados en las inmunizaciones..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1.1. Antígenos..... | 36 |
| 3.2.1.1.1. Albúmina sérica bovina..... | 36 |
| 3.2.1.1.2. Lisado de la cepa 5011 de <i>S. aureus</i> | 36 |
| 3.2.1.2. Formulaciones adyuvantes. | 37 |
| 3.2.1.2.1. Ginsenosido Rg1. | 37 |
| 3.2.1.2.2. Liposomas multilaminares empleados en las inmunizaciones..... | 37 |
| 3.2.1.3. Animales. | 38 |
| 3.2.2. Ensayo 1: ensayo preliminar para determinar la concentración de Rg1 a inocular en ratones..... | 39 |
| 3.2.2.1. Diseño experimental..... | 39 |
| 3.2.2.2. Evaluación del estado de salud de los animales. | 40 |
| 3.2.2.3. Determinación de IgG total anti-BSA mediante ELISA indirecto. | 40 |
| 3.2.3. Ensayo 2: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando BSA como antígeno. | 41 |
| 3.2.3.1. Plan de inmunización..... | 41 |
| 3.2.3.2. Evaluación de la respuesta humoral inducida en ratones inmunizados con diferentes formulaciones adyuvantes mediante ELISA indirecto. | 41 |
| 3.2.4. Ensayo 3: ensayo preliminar de inmunización en ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) y empleando un lisado de <i>S. aureus</i> como antígeno..... | 42 |
| 3.2.4.1. Plan de inmunización..... | 42 |
| 3.2.4.2. Evaluación de la respuesta humoral inducida en ratones inmunizados con las formulaciones adyuvantes y con un lisado de <i>S. aureus</i> mediante ELISA indirecto..... | 43 |
| 3.2.4.3. Evaluación de la respuesta celular inducida en ratones inmunizados con las formulaciones adyuvantes y con un lisado de <i>S. aureus</i> mediante ensayos de linfoproliferación y caracterización de citoquinas. | 44 |
| 3.2.4.3.1. Cultivo primario de células aisladas de bazo murino. | 44 |
| 3.2.4.3.2. Evaluación de la respuesta linfoproliferativa mediante un kit de MTT..... | 44 |
| 3.2.4.3.3. Caracterización del perfil de citoquinas inducido mediante ELISA indirecto. | 45 |
| 3.2.4.3.3.1. Cuantificación IFN γ | 45 |
| 3.2.4.3.3.2. Cuantificación IL-4. | 46 |
| 3.2.5. Ensayo 4: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando un lisado de <i>S. aureus</i> como antígeno..... | 46 |
| 3.2.5.1. Plan de inmunización..... | 46 |
| 3.2.5.2. Evaluación de la RI humoral inducida en ratones inmunizados con las formulaciones adyuvantes y un lisado de <i>S. aureus</i> | 47 |

| | |
|--|----|
| 3.2.5.3. Evaluación de la RI celular inducida en ratones inmunizados con las formulaciones adyuvantes y un lisado de <i>S. aureus</i> mediante ensayos de linfoproliferación con CFSE..... | 47 |
| 3.2.6. Análisis estadístico..... | 49 |
| 4. RESULTADOS | 51 |
| 4.1. Evaluación del potencial inmunomodulatorio de Rg1 en células bovinas <i>in vitro</i> | 52 |
| 4.1.1. Efecto de Rg1 en la viabilidad de células bovinas..... | 52 |
| 4.1.2. Efecto de Rg1 en la expresión génica de componentes de la inmunidad innata en células MAC-T..... | 53 |
| 4.1.3. Efecto de Rg1 en la expresión génica de componentes de la inmunidad innata en MSMC..... | 54 |
| 4.1.4. Efecto de Rg1 en la expresión proteica de TLR2 y TLR4 en MSMC y PBMC..... | 56 |
| 4.1.5. Efecto de Rg1 en la producción intracelular de ROS luego del co-cultivo de MSMC y PBMC con <i>S. aureus</i> | 57 |
| 4.1.6. Efecto de Rg1 en la expresión de CMH-II y CD80 en MSCM y PBMC..... | 58 |
| 4.2. Evaluación de la capacidad adyuvante de Rg1 en un modelo murino <i>in vivo</i> | 59 |
| 4.2.1. Ensayo 1: ensayo preliminar para determinar la concentración de Rg1 a inocular en ratones..... | 59 |
| 4.2.1.1. Evaluación del estado de salud de los animales..... | 59 |
| 4.2.1.2. Determinación de IgG total anti-BSA..... | 60 |
| 4.2.2. Ensayo 2: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando BSA como antígeno..... | 61 |
| 4.2.2.1. Evaluación de la estabilidad de los liposomas..... | 61 |
| 4.2.2.2. Evaluación del estado de salud de los animales..... | 61 |
| 4.2.2.3. Evaluación de la RI humoral inducida en ratones inmunizados con diferentes formulaciones adyuvantes..... | 61 |
| 4.2.3. Ensayo 3: ensayo preliminar de inmunización en ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) y empleando un lisado de <i>S. aureus</i> como antígeno..... | 62 |
| 4.2.3.1. Evaluación del estado de salud de los animales..... | 62 |
| 4.2.3.2. Evaluación de la RI humoral inducida en ratones inmunizados con un lisado de <i>S. aureus</i> | 62 |
| 4.2.3.2.1. Determinación del título de IgG total anti- <i>S. aureus</i> | 62 |
| 4.2.3.2.2. Determinación del título de IgG2a anti <i>S. aureus</i> | 63 |
| 4.2.3.3. Evaluación de la RI celular inducida mediante ensayos de linfoproliferación y caracterización de citoquinas..... | 64 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.3.3.1. Ensayos de linfoproliferación..... | 64 |
| 4.2.3.3.2. Caracterización del perfil de citoquinas..... | 65 |
| 4.2.3.3.2.1. Cuantificación de IFN γ | 65 |
| 4.2.3.3.2.2. Cuantificación de IL-4. | 66 |
| 4.2.4. Ensayo 4: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando un lisado de <i>S. aureus</i> como antígeno..... | 67 |
| 4.2.4.1. Evaluación del estado de salud de los animales. | 67 |
| 4.2.4.2. Evaluación de la RI humoral inducida en ratones inmunizados con un lisado de <i>S. aureus</i> | 67 |
| 4.2.4.2.1. Determinación del título de IgG total anti <i>S. aureus</i> | 67 |
| 4.2.4.2.2. Determinación del título de IgG2a anti- <i>S. aureus</i> | 68 |
| 4.2.4.3. Evaluación de la RI celular inducida en ratones inmunizados con un lisado de <i>S. aureus</i> | 68 |
| 5. DISCUSIÓN | 70 |
| 5.1. Evaluación del potencial inmunomodulatorio de Rg1 en células bovinas <i>in vitro</i> | 71 |
| 5.2. Evaluación de la capacidad adyuvante de Rg1 en un modelo murino <i>in vivo</i> | 76 |
| 6. CONCLUSIONES | 82 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 85 |
| 8. ANEXOS | 102 |
| Anexo I..... | 103 |
| I. Anticuerpos utilizados en ensayos de CF y ELISA..... | 103 |
| Anexo II..... | 104 |
| II.1. Ensayo 1: ensayo preliminar para determinar la concentración de Rg1 a inocular en ratones. | 104 |
| II.1.1. Registro de pesos..... | 104 |
| II.2. Ensayo 2: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando BSA como antígeno. | 105 |
| II.2.1. Registro de pesos..... | 105 |
| II.2.2. Hemogramas..... | 106 |
| II.3. Ensayo 3: ensayo preliminar de inmunización en ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) y empleando un lisado de <i>S. aureus</i> como antígeno..... | 106 |

| | |
|--|-----|
| II.3.1. Registro de pesos..... | 106 |
| II.3.2. Controles positivos empleados en la evaluación de la respuesta celular. | 107 |
| II.3.2.1. Ensayos de proliferación mediante MTT..... | 107 |
| II.3.2.2. Cuantificación de citoquinas mediante ELISA indirecto. | 108 |
| II.4. Ensayo 4: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando un lisado de <i>S. aureus</i> como antígeno..... | 109 |
| II.4.1. Registro de pesos..... | 109 |
| II.4.2. Hemogramas..... | 110 |
| II.4.3. Controles positivos empleados en los ensayos de proliferación celular mediante CFSE. | 111 |

Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| 2H-PPD | 20S-dihydroprotopanaxadiol |
| A467 | Alexa Fluor 647 |
| A488 | Alexa Fluor 488 |
| ADNc | ADN copia |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| AP-1 | Proteína de activación 1 |
| APC | Allofococianina |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| AS | Antisentido |
| ATB/AM | Penicilina/sulfato de estreptomicina |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| CD | Clúster de diferenciación |
| CDs | Células dendríticas |
| CEM | Células epiteliales mamarias |
| CF | Citometría de flujo |
| CFSE | Éster succinimidil diacetato de carboxifluoresceína |
| Chol | Colesterol |
| CK | Compuesto K |
| CMH-I | Complejo mayor de histocompatibilidad clase I |
| CMH-II | Complejo mayor de histocompatibilidad clase II |
| Con A | Concavalina A |
| COX-2 | Ciclooxigenasa-2 |
| CPA | Células presentadoras de antígenos |
| DNAsa | Desoxirribonucleasa |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos |
| DO | Densidad óptica |
| DPPC | Dipalmitoilfosfatidil colina |
| DSL | Dispersión dinámica de la luz |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EAGG | Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja |
| EEM | Error estándar de la media |

| | |
|---------------|---|
| ELISA | Inmunoensayo enzimático |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FSC | <i>Forward scatter</i> (tamaño) |
| GM | Glándula mamaria |
| HBsAg | Antígeno de superficie de la hepatitis B |
| HE | Hidroetidina |
| HRP | Peroxidasa |
| IFA | Adyuvante incompleto de Freund |
| IFN γ | Interferón gamma |
| IIM | Infección intramamaria |
| IL | Interleuquina |
| iNOS | Óxido nítrico sintasa inducible |
| IP | Índice de proliferación |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LTA | Ácido lipoteicoico |
| MAC-T | Línea celular del epitelio alveolar mamario bovino |
| MLG | Modelos lineales generalizados |
| MRI | Modificadores de la respuesta inmune |
| MSMC | Células mononucleares de secreción mamaria |
| MyD88 | Proteína adaptadora de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 |
| NF κ B | Factor de transcripción nuclear kappa B |
| ON | Óxido nítrico |
| ON | <i>Overnight</i> |
| OVA | Ovoalbúmina |
| pb | Pares de bases |
| PBMC | Células mononucleares de sangre periférica |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PE | Ficoeritrina |
| <i>Pg</i> | <i>Panax ginseng</i> |
| PMA | Forbol-12-miristato-13-acetato |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| RCS | Recuento de células somáticas |
| RI | Respuesta inmune |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |

| | |
|------------------|---|
| rSAG1 | Antígeno de superficie 1 de <i>Toxoplasma gondii</i> recombinante |
| RT | Transcripción reversa |
| S | Sentido |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| SA | Estearilamina |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SSC | <i>Side scatter</i> (complejidad citoplasmática) |
| TA | Temperatura ambiente |
| Ta | Temperatura de hibridación o <i>annealing</i> |
| TBS | Buffer tris salino |
| Tc | Linfocitos T citotóxicos |
| Th | Linfocitos T <i>helper</i> o colaboradores |
| Thf | Linfocitos Th foliculares |
| TLR | Receptor tipo <i>toll</i> |
| TMB | Tetrametilbenzidina |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TSB | Tripteína soya |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |

Índice de figuras.

| | |
|--|----|
| Figura 1. Gráficos representativos de la estrategia de selección de las poblaciones de interés para el análisis de la expresión de TLR2 y TLR4 en células mononucleares de secreción mamaria y sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente). | 31 |
| Figura 2. Gráficos representativos de la estrategia de selección de las poblaciones de interés para el análisis de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células mononucleares de secreción mamaria y sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente) FITC ⁺ | 33 |
| Figura 3. Gráficos representativos de la estrategia de selección de las poblaciones de interés para el análisis de la expresión de CMH-II y CD80 en células mononucleares de secreción mamaria y de sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente). | 35 |
| Figura 4. Evaluación de la estabilidad de los liposomas combinados con Rg1 y/o albúmina sérica bovina (BSA). | 38 |
| Figura 5. Gráficos representativos de la estrategia de selección de la población de interés para el análisis de linfoproliferación..... | 49 |
| Figura 6. Viabilidad de células MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de Rg1 (0, 10, 20, 50 y 100 µg/ml) durante 2, 8 y 24 hs..... | 52 |
| Figura 7. Viabilidad de células aisladas de secreción mamaria y sangre tratadas con 0 y 250 µg/ml de Rg1 durante 24 hs. | 53 |
| Figura 8. Efecto de Rg1 en la expresión génica en células MAC-T. | 54 |
| Figura 9. Efecto de Rg1 en la expresión génica de TLRs en células mononucleares de secreción mamaria (MSMC)..... | 55 |
| Figura 10. Efecto de Rg1 en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias en células mononucleares de secreción mamaria (MSMC)..... | 56 |
| Figura 11. Porcentaje de expresión proteica de TLR2 y TLR4 en células mononucleares de secreción y de sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente) tratadas con Rg1 (250 µg/ml), lipopolisacárido (LPS, 2,5 µg/ml) y ácido lipoteicoico (LTA, 2,5 µg/ml) durante 24 hs.... | 57 |
| Figura 12. Porcentaje de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células mononucleares de secreción y de sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente) FITC ⁺ | |

| | |
|--|-----|
| tratadas con Rg1 (250 µg/ml) y forbol-12-mistirato-13-acetato (PMA, 50 ng/ml) durante 24 hs. | 58 |
| Figura 13. Porcentaje de macrófagos y monocitos (células CD14 ⁺) y porcentaje de expresión de CMH-II y CD80 en macrófagos y monocitos tratados con Rg1 (250 µg/ml), lipopolisacárido (LPS, 2,5 µg/ml) y ácido lipoteicoico (LTA, 2,5 µg/ml) durante 24 hs. | 59 |
| Figura 14. Niveles de IgG total anti-albúmina sérica bovina (anti-BSA) evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales a los distintos tiempos de toma de muestra. | 60 |
| Figura 15. Niveles de IgG total anti-albúmina sérica bovina (anti-BSA) evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. | 62 |
| Figura 16. Títulos de IgG total anti- <i>S. aureus</i> evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. | 63 |
| Figura 17. Títulos de IgG2a anti- <i>S. aureus</i> evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. | 64 |
| Figura 18. Índice de proliferación (IP) en células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con 5 µg/ml y 10 µg/ml de lisado de <i>S. aureus</i> | 65 |
| Figura 19. Producción de IFN γ en sobrenadantes de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con 5 µg/ml y 10 µg/ml de lisado de <i>S. aureus</i> | 66 |
| Figura 20. Títulos de IgG total evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. | 67 |
| Figura 21. Títulos de IgG2a anti- <i>S. aureus</i> evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. | 68 |
| Figura 22. Proliferación de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con 10 µg/ml de lisado de <i>S. aureus</i> (% células CFSE positivas). | 69 |
| Figura 23. Peso (g) de los animales de cada grupo experimental en función a los días de toma de muestra (ensayo 1). | 104 |
| Figura 24. Peso (g) de los animales de cada grupo experimental en función a los días de toma de muestra (ensayo 2). | 105 |
| Figura 25. Peso (g) de los animales de cada grupo experimental en función a los días de toma de muestra (ensayo 3). | 107 |

| | |
|--|-----|
| Figura 26. Índice de proliferación en células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con lisado de <i>S. aureus</i> (5 µg/ml y 10 µg/ml), anti-CD3 (2,5 µg/ml) y basales..... | 108 |
| Figura 27. Producción de IFNγ en sobrenadante de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con lisado de <i>S. aureus</i> (5 µg/ml y 10 µg/ml), anti-CD3 (2,5 µg/ml) y basales. | 108 |
| Figura 28. Producción de IL-4 en sobrenadante de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con anti-CD3 (2,5 µg/ml) y basales. | 109 |
| Figura 29. Peso (g) de los animales de cada grupo experimental en función a los días de toma de muestra (ensayo 4). | 110 |
| Figura 30. Proliferación de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con lisado de <i>S. aureus</i> (10 µg/ml), Con A (5 µg/ml) y basales. | 112 |

Índice de tablas.

| | |
|---|-----|
| Tabla 1: Cebadores específicos para los diferentes genes evaluados. | 28 |
| Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados en los diferentes ensayos y técnicas. | 103 |
| Tabla 3. Parámetros hematológicos evaluados en muestras de sangre en los diferentes grupos experimentales, luego del sacrificio de los animales (ensayo 2). | 106 |
| Tabla 4. Parámetros hematológicos evaluados en muestras de sangre en los diferentes grupos experimentales, luego del sacrificio de los animales (ensayo 4). | 111 |

Resumen

Los ginsenósidos (saponinas) de la raíz de *Panax ginseng* (*Pg*) han sido utilizados como adyuvantes de vacunas de uso veterinario. Numerosos antecedentes postulan a *Pg* como un compuesto potenciador de la respuesta inmune en glándula mamaria bovina, incrementando así la resistencia a las infecciones contra mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). El objetivo general de esta tesis fue estudiar el potencial inmunomodulatorio del ginsenósido Rg1 en cultivos de células MAC-T y células mononucleares de secreción mamaria (MSMC) y evaluar su efecto sobre la activación de MSMC y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Asimismo, se propuso evaluar su capacidad adyuvante *in vivo* en ratones. *In vitro*, Rg1 indujo la expresión génica de TLR2 y TLR4 en células MSMC y la expresión proteica de ambos receptores en MSMC y PBMS. Además, Rg1 aumentó la producción de ROS en MSMC y PBMC luego del co-cultivo con *S. aureus*. Finalmente, Rg1 indujo la expresión de CMH-II y CD80 en PBMS pero no en MSMC. En un modelo de inmunización *in vivo* en ratones con un lisado de *S. aureus*, Rg1 estimuló la respuesta inmune humoral mediante la producción de anticuerpos IgG total específicos anti-*S. aureus* e indujo la proliferación celular en células re-estimuladas. El presente trabajo ha sido de utilidad para conocer el efecto inmunoestimulante de Rg1 y su capacidad adyuvante, con el fin de utilizarlo como posible candidato en prototipos de vacuna contra mastitis bovina causada por *S. aureus*.

Palabras claves: Ginsenósido, Rg1, efecto inmunomodulatorio, capacidad adyuvante, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

The ginsenosides (saponins) from the root of *Panax ginseng* (Pg) have been used as adjuvants in veterinary vaccines. Numerous antecedents postulate Pg as a compound that enhances the immune response in the bovine mammary gland, increasing resistance to infections against mastitis caused by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). The aim of this thesis was to study the immunomodulatory potential of Rg1 ginsenoside in MAC-T cells and mammary secretory mononuclear cells (MSMC) and to evaluate its effect on the activation of MSMC and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Moreover, it was proposed to evaluate its adjuvant capacity in mice in an experimental model *in vivo*. *In vitro*, Rg1 induced the gene expression of TLR2 and TLR4 in MSMC cells and the protein expression of both receptors in MSMC and PBMS. Furthermore, Rg1 increased ROS production in MSMC and PBMC after co-cultivation with *S. aureus*. Finally, Rg1 induced the expression of MHC-II and CD80 in PBMS but not in MSMC. In an *in vivo* immunization model with *S. aureus* lysate, Rg1 stimulated the humoral immune response by production of anti-*S. aureus* specific antibodies and induced cell proliferation in *S. aureus* re-stimulated cells. The present work has been useful to know the immunostimulant effect of Rg1 and its adjuvant capacity, in order to use it as a possible candidate in prototypes of vaccine against bovine mastitis caused by *S. aureus*.

Keywords: Ginsenoside, Rg1, immunomodulatory effect, adjuvant capacity, *Staphylococcus aureus*.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Mastitis bovina.

1.1.1. Generalidades.

La mastitis bovina, es la inflamación de la glándula mamaria (GM), que puede ocurrir en respuesta a lesiones traumáticas, a sustancias irritantes o a la presencia de agentes infecciosos y sus toxinas que han logrado colonizar el tejido secretor (Halasa *et al.*, 2007). Si bien puede ser causada por diversos factores, con mayor frecuencia se debe a una infección intramamaria (IIM) de origen bacteriano (Zhao y Lacasse, 2008; Bogni *et al.*, 2011).

La mastitis es el resultado de la interacción entre el hospedador, el agente infeccioso y los factores ambientales donde reside el animal (Zhao y Lacasse, 2008). El riesgo de contraer una IIM depende de la capacidad del sistema inmune del animal para neutralizarla, del tipo, número y patogenicidad de las bacterias presentes en un rodeo y, fundamentalmente, de las condiciones del medio ambiente y del manejo del ordeño en un establecimiento en particular (Corbellini, 2002). Si bien se han identificado más de 80 agentes infecciosos, incluyendo especies de hongos, micoplasmas y algas, las bacterias son los principales agentes causales de mastitis bovina (Bogni *et al.*, 2011; Gomes y Henriques, 2016).

La mastitis bovina es uno de los mayores factores limitantes a la rentabilidad de la producción lechera en el mundo (Ruegg, 2017). Las consecuencias económicas de la mastitis se deben a los costos de tratamiento, las pérdidas de producción, el sacrificio de animales, los cambios en la calidad del producto y el riesgo de otras enfermedades (Halasa *et al.*, 2007; Bobbo *et al.*, 2017; Ruegg, 2017).

Los métodos de diagnóstico de mastitis más utilizados son el recuento de células somáticas (RCS) y el cultivo bacteriológico de la leche (Bogni *et al.*, 2011). Las células somáticas son leucocitos (principalmente neutrófilos y macrófagos) y células epiteliales presentes en la leche. Por lo tanto, el RCS está directamente relacionado con el estado inmunológico de la ubre y aumentan en respuesta a un estímulo inflamatorio como una infección bacteriana, siendo un importante indicador para la salud de la GM y la calidad de la leche (Sarıkaya *et al.*, 2006).

Los programas actuales de control de mastitis fueron desarrollados en la década del 60 (Booth, 1975; Calvino y Tirante, 2005) e incluyen procedimientos de ordeño apropiados, mantenimiento y buen uso del equipo de ordeño, administración de antibióticos para el tratamiento de mastitis clínicas durante el ordeño o como terapia de secado y el descarte de animales con IIM crónicas. En nuestro país se observó un importante avance en el control de la

mastitis en los últimos 30 años, fundamentalmente debido a la implementación de protocolos de buenas prácticas en el tambo. Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad sigue siendo elevada (Signorini *et al.*, 2008a; Dieser *et al.*, 2014).

1.1.2. Mastitis causada por *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina (Dieser *et al.*, 2014; Calvino, 2017) como en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi *et al.*, 2006; Reyher *et al.*, 2011; Bardiau *et al.*, 2014, 2016). En nuestro país, un estudio que incluyó muestras de 20.117 vacas en lactancia pertenecientes a 112 tambos con problemas de mastitis ubicados en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires, mostró que los patógenos aislados con mayor frecuencia fueron *S. aureus* con el 57%, *Streptococcus agalactiae* con el 29%; mientras que los miembros del grupo de *Streptococcus* no-agalactiae fueron hallados en el 12% de los animales. *Staphylococcus aureus* fue aislado casi en la totalidad de los rodeos analizados (> 97%) (Signorini *et al.*, 2008b). 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 RCS > 200.000/ml. A partir de estas muestras, los organismos patógenos más frecuentemente aislados fueron *Staphylococcus coagulans* negativos (52,1%), seguidos por *S. aureus* (21,3%), *Corynebacterium spp.* (5,2%), *S. agalactiae* (4,4%) y *S. dysgalactiae* (4,4%) (Dieser *et al.*, 2014).

Las características patogénicas de *S. aureus* determinan que las IIM producidas por dicha bacteria no sean efectivamente controladas 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.

Staphylococcus aureus es un organismo esférico (cocos), gram-positivo, dispuesto de a pares, tétradas o grupos irregulares. Se caracteriza por ser anaerobio facultativo (metabolismo respiratorio y fermentativo), inmóvil, no forman esporas, catalasa positivo y oxidasa negativo. Si bien *S. aureus* se ha considerado ampliamente como una bacteria extracelular, también se ha demostrado que puede comportarse como intracelular, ya que posee la habilidad de invadir y sobrevivir dentro de diferentes tipos celulares, incluyendo células epiteliales mamarias (CEM), neutrófilos y macrófagos (Sinha y Fraunholz, 2010; Pereyra *et al.*, 2016; Sacco *et al.*, 2020). La forma de vida intracelular puede facilitar la persistencia de *S. aureus* en la GM, protegiéndose

de los tratamientos con antimicrobianos y de las defensas inmunes del hospedador (Sendi y Proctor, 2009).

Las GM infectadas y la colonización extramamaria en animales lecheros son los principales reservorios de *S. aureus*, por lo cual, la principal forma de transmisión de este patógeno entre vacas ocurre durante el ordeño (Zecconi *et al.*, 2006). La ruta más común de invasión es a través del orificio y canal del pezón. *Staphylococcus aureus* coloniza el extremo del pezón y/o lesiones del mismo. La diseminación de la infección puede ocurrir a través de las manos del ordeñador, toallas húmedas, las pezoneras, y las moscas. Durante el ordeño, fluctuaciones irregulares de vacío pueden forzar a la bacteria dentro del canal del pezón, provocando una potencial nueva infección (Rainard *et al.*, 2018).

En las vacas lecheras, la mastitis por *S. aureus* es comúnmente subclínica y se manifiesta por elevados RCS y persistencia de las bacterias en la GM (Rainard *et al.*, 2018). Los casos subclínicos tienen especial importancia ya que pasan desapercibidos para el productor y afectan en gran medida la producción de los animales. Aunque la mayoría de los casos de mastitis por *S. aureus* son subclínicos, las vacas crónicas suelen presentar elevados RCS, tejido mamario anormal y casos recurrentes de mastitis clínica (con signos de inflamación evidentes en la GM y alteraciones visibles en la leche) (Suliman *et al.*, 2012).

1.1.3. Periodo de involución de la GM e IIM.

La involución de la GM 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 *et al.*, 2014). Este proceso, comúnmente denominado secado, comienza al finalizar la lactancia y es fundamental para asegurar una máxima producción de leche durante la lactancia siguiente (Sørensen y Enevoldsen, 1991).

La GM bovina es altamente susceptible a nuevas IIM durante la etapa temprana del secado y en el parto, cuando las defensas están deprimidas (Oliver y Sordillo, 1988, 1989). Las IIM que se originan en el periodo no lactante pueden reducir la producción láctea hasta en un 35% en la lactancia subsiguiente (Sordillo y Nickerson, 1988) y comúnmente se asocian con mastitis clínicas durante el primer mes de lactancia (Oliver y Mitchell, 1983). El uso de antibióticos intramamarios administrados al inicio del periodo seco controla parcialmente las IIM presentes al secado y disminuye las IIM al parto (Bramley y Dodd, 1984; Eberhart, 1986). Sin embargo, 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 dirigidas a reforzar tanto la terapia antimicrobiana administrada al secado, como los factores protectores naturales de la GM.

1.2. Mecanismos de defensa de la GM bovina.

La GM es un órgano dinámico y complejo compuesto por diferentes células que funcionan de manera coordinada con el propósito de sintetizar y secretar leche (Eubanks Ryman *et al.*, 2015). Además, presentan funciones inmunológicas que confieren protección, tanto a la misma GM como al neonato. De esta manera, los anticuerpos secretados en el calostro tienen por función proteger al ternero recién nacido contra agentes infecciosos (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Los mecanismos de defensa de la GM bovina involucran diversos factores anatómicos, celulares y moleculares que se engloban dentro de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Estos mecanismos interactúan estrecha y coordinadamente con el fin de brindar protección frente a los microorganismos causantes de mastitis. La eficacia de estas respuestas determina la susceptibilidad o la resistencia a la infección de la GM bovina (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

La interacción entre el sistema inmune del hospedador y los patógenos causantes de mastitis es intrincada, ya que ambos han logrado co-evolucionar para reconocer, responder y adaptarse al otro. Por un lado, los patógenos microbianos han desarrollado diversas estrategias para alterar y evadir las defensas del hospedador con el fin de sobrevivir. Por el otro, el sistema inmune del hospedador también posee la capacidad de adaptarse y dispone de un gran arsenal para controlar o eliminar la amenaza microbiana. Aun así, es ampliamente aceptado que la susceptibilidad de los individuos dentro de una especie determinada difiere para un mismo patógeno microbiano (Thompson-Crispi *et al.*, 2014).

Las bacterias expresan un gran repertorio de factores de virulencia que se producen en concentraciones variables dependiendo de la etapa de infección (Bharathan y Mullarky, 2011) y que en parte determinan las diferencias en la magnitud y la duración de la respuesta inmune (RI) del hospedador (Thompson-Crispi *et al.*, 2014). Esta variabilidad en la interacción patógeno-hospedador está controlada por la composición genética inherente del hospedador, incluidas las RI innatas y adaptativas, particularmente la memoria inmunológica adquirida, así como por la naturaleza del agente patógeno (Hermann, 2007).

1.2.1. RI innata.

La RI innata constituye la línea de defensa inicial de la GM bovina, siendo el factor determinante clave del establecimiento, progresión y gravedad de la infección, así como del desarrollo de la RI adaptativa (Aitken *et al.*, 2011; Sordillo, 2018).

Las defensas innatas contra los patógenos de mastitis consisten en barreras anatómicas provistas por el canal del pezón, defensas celulares como los leucocitos de la leche y tejido con sus receptores celulares y defensas solubles compuestas por una variedad de factores moleculares no celulares (Sordillo, 2018).

1.2.1.1. Barreras anatómicas.

El canal del pezón es la primera línea de barrera anatómica contra los patógenos causantes de mastitis (Meglia y Mata, 2017). Este canal está sellado entre ordeños y en el período de secado por un recubrimiento de queratina que constituye una barrera física que impide la penetración de las bacterias. Además, la queratina presenta propiedades antibacterianas (Rainard y Riollet, 2006) y es capaz de unirse e inmovilizar a la mayoría de las cepas de bacterias no capsuladas causantes de mastitis (Rainard, 2005). Lesiones en la piel y en el canal del pezón predisponen a la colonización por bacterias tales como *S. aureus*, y pueden resultar en una nueva IIM.

1.2.1.2. Defensas celulares.

Cuando las bacterias son capaces de atravesar el canal del pezón, la segunda línea de defensa son las barreras celulares, tanto las CEM como las células de la inmunidad innata, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (CDs) y células *natural killer* (NK). A pesar de la diversidad de células presentes en la GM, los macrófagos de la leche, los leucocitos residentes y las CEM son las primeras células en ponerse en contacto y reconocer a patógenos bacterianos que ingresan a la GM (Zhao *et al.*, 2015).

Las CEM revisten el canal del pezón, la cisterna de la glándula (cisterna encargada de almacenar leche en los intervalos entre ordeños) y los alvéolos (tejido epitelial productor de leche). 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 del patógeno y en el inicio y desarrollo del proceso inflamatorio, sintetizando y secretando citoquinas, quimioquinas y proteínas de fase aguda (Rainard y Riollet, 2006). Son capaces de

secretar citoquinas tanto del perfil T *helper* (Th) 1 (interleuquina (IL)-12, interferón gamma (IFN γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)) como del perfil Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5), dependiendo del estado de diferenciación promovido por hormonas lactogénicas (prolactina, dexametasona e insulina) (Khaled *et al.*, 2007; Watson, 2009; Günther *et al.*, 2011). Además, las CEM, tienen la capacidad de fagocitar células epiteliales apoptóticas y contribuir a la remodelación de la GM durante el periodo de involución (Monks *et al.*, 2005, 2008).

Los macrófagos son fagocitos profesionales que residen en el tejido o se desarrollan a partir de monocitos que ingresan al tejido desde los vasos sanguíneos. Su función principal es la eliminación de patógenos invasores del sitio de infección y la presentación de antígenos a las células T en la periferia y órganos linfáticos (Bekeredjian-Ding *et al.*, 2015). Por lo tanto, la activación de los macrófagos es un evento clave para el desencadenamiento de la RI innata y adaptativa (Lee *et al.*, 2007). La activación de macrófagos induce la liberación de citoquinas proinflamatorias, como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1) y de moléculas citotóxicas como óxido nítrico (ON) y las especies reactivas del oxígeno (ROS). Además, induce regulación positiva de la expresión de moléculas presentes en la superficie celular como clúster de diferenciación (CD) 14, moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y de adhesión (selectinas e integrinas) (Dunzendorfer *et al.*, 2004; Kim y Cho, 2013; Yang *et al.*, 2017). Los macrófagos son el tipo celular predominante en leche y GM sanas, involucionadas y lactantes (Sarikaya *et al.*, 2006; Sordillo, 2018).

Los neutrófilos representan el tipo de células predominantes durante la inflamación temprana del tejido mamario. Son rápidamente reclutados desde la sangre a la GM en respuesta a las sustancias quimiotácticas secretadas por los macrófagos, donde reconocen, fagocitan y matan a los patógenos invasores, evitando la proliferación y colonización de bacterias de crecimiento rápido (Sarikaya *et al.*, 2006; Bougarn *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015).

1.2.1.3. Defensas solubles.

Numerosos factores solubles se han asociado con las defensas innatas de la GM bovina. Entre ellos se encuentran diversos elementos contenidos en la leche con acción sobre las bacterias, tales como: citoquinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa, transferrina, ON y componentes del sistema de complemento.

Las citoquinas juegan un papel importante en la defensa del hospedador contra los microorganismos. Son un grupo heterogéneo de proteínas sintetizadas naturalmente por una amplia variedad de células, principalmente por células inmunes, que actúan como mensajeros químicos de la respuesta inmunológica (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Las citoquinas amplifican y

dirigen la generación de patrones apropiados de inmunidad para combatir amenazas microbianas particulares e inducen inflamación local protectora y respuestas sistémicas de fase aguda (Holdsworth y Can, 2015). Las citoquinas proinflamatorias promueven la inflamación rápidamente después del reconocimiento del patógeno, mientras que las citoquinas antiinflamatorias suprimen y limitan la actividad de las proinflamatorias. 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 *et al.*, 2005; Bannerman, 2009).

Una gran variedad de citoquinas, tales como interleuquinas (ILs), factor estimulante de colonias, IFN γ y TNF α han sido encontrados en GM sana e infectada (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Entre ellas, las citoquinas TNF α , IL-1 β e IL-6 y las quimioquinas IL-8 y CCL-2 promueven la inflamación (Schukken *et al.*, 2011).

El TNF α es una citoquina proinflamatoria secretada por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales en momentos tempranos de la RI innata (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). A nivel local, induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, promoviendo el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, mientras que, a nivel sistémico, induce fiebre y la producción de proteínas de fase aguda (Bannerman, 2009).

La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria producida por monocitos, macrófagos, CD4, y células epiteliales (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Bannerman, 2009). La expresión de IL-1 β es inducida en respuesta a bacterias, virus, hongos y parásitos, como así también por fuentes no microbianas, como TNF α , IL-12 y componentes del complemento (C5a). Además de ser inducida por otras citoquinas, IL-1 β provoca la producción de otras citoquinas tales como TNF α , IL-6, IL-8 e IL-12 (Bannerman, 2009). Durante la respuesta inflamatoria, esta citoquina regula la expresión de moléculas de adhesión en las células epiteliales y la quimiotaxis de neutrófilos en infecciones causadas por *Escherichia coli* (*E. coli*). El rol de la IL-1 β en infecciones causadas por *S. aureus* es importante solo en etapas tempranas (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica, producida principalmente por macrófagos, linfocitos T y células endoteliales (Holdsworth y Can, 2015). Es un potente inductor de la inflamación local y sistémica, siendo clave en la respuesta de fase aguda en la inflamación (Günther *et al.*, 2011; Holdsworth y Can, 2015). Su expresión es inducida por bacterias y virus, como así también por citoquinas tales como IL-1 β y TNF α (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Bannerman, 2009). Su presencia es activa en mastitis causadas por bacterias coliformes, mientras que es insignificante en las IIM causadas por *S. aureus* (Alluwaimi *et al.*, 2003).

La IL-8, también conocida como ligando 8 del motivo CXC (CXCL8), es una quimioquina proinflamatoria (An *et al.*, 2019), producida por monocitos, linfocitos T y macrófagos, así como

células epiteliales y endoteliales (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Su expresión puede ser inducida por un estímulo proinflamatorio exógeno (bacterias o virus) o endógeno (TNF α o IL-1 β). La IL-8 promueve la respuesta inflamatoria a través de la estimulación tanto del reclutamiento como de la funcionalidad de los neutrófilos (Bannerman, 2009; An *et al.*, 2019). En mastitis causada por *E. coli* se produce en altas concentraciones mientras que en mastitis causada por *S. aureus* está presente en bajas concentraciones (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

El IFN γ tiene un rol importante en la conexión de la inmunidad innata y adquirida y es fundamental en la respuesta frente a patógenos intracelulares. Es producido principalmente por macrófagos, CDs, células NK y linfocitos (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). El IFN γ induce la actividad microbicida de macrófagos y neutrófilos favoreciendo la fagocitosis mediada por receptores, el estallido respiratorio y la producción de ON. El IFN γ regula positivamente la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH-I) en la superficie celular, promoviendo la inmunidad mediada por linfocitos T citotóxicos. Por otro lado, el IFN γ también regula positivamente la vía de presentación antigénica en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH-II) y la activación de linfocitos T CD4⁺ (Bannerman, 2009).

La IL-4 ejerce una acción antagonista para IFN γ y su función principal es la regulación de respuestas inmunes mediadas por IgE. Además, IL-4 estimula la diferenciación de los linfocitos Th0 hacia Th2, es decir, la RI humoral (Fonseca y Silva, 2009). Los transcritos de esta citoquina no fueron detectados en leche de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* (Riollet *et al.*, 2001).

1.2.1.4. Interacción entre microorganismos patógenos y células del hospedador.

1.2.1.4.1. Receptores tipo *toll*.

Los receptores tipo *toll* (TLRs) corresponden a una familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), altamente conservados en mamíferos, con un rol esencial en la inmunidad innata. Son glicoproteínas integrales de membrana, caracterizadas por tener un dominio de reconocimiento de diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), un dominio transmembrana y un dominio TIR, fundamental en la transducción de la señal (Brubaker *et al.*, 2015). La activación de estos receptores conduce a la liberación de mediadores inflamatorios (Akira *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2020).

Los TLRs se encuentran expresados en la mayoría de las células inmunes innatas, incluyendo macrófagos, CDs, mastocitos, linfocitos B y T e incluso, en células epiteliales de

mucosas y fibroblastos (Akira *et al.*, 2006; Bougarn *et al.*, 2010). Están localizados en la superficie celular o en compartimentos endosomales (Fu *et al.*, 2013; Parra *et al.*, 2020). La expresión de estos receptores no es estática, sino que se modula rápidamente en respuesta a patógenos, citoquinas y factores de estrés (Akira *et al.*, 2006).

En los últimos años, se han descrito 10 tipos de TLRs en bovinos (McGuire *et al.*, 2006; Werling *et al.*, 2006, 2017). En particular, TLR2 es uno de los principales receptores en la respuesta frente a *S. aureus*, desempeña un rol clave en el reconocimiento de estructuras de la pared celular de bacterias gram-positivas, como el ácido lipoteicoico (LTA) y el peptidoglicano (Musilova *et al.*, 2019). 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, CDs, mastocitos y también CEM bovinas expresan TLR2 (McCurdy *et al.*, 2003; Sabroe *et al.*, 2003; Esen *et al.*, 2004; Bougarn *et al.*, 2010; Musilova *et al.*, 2019). Por otro lado, TLR4 es uno de los principales receptores en la respuesta frente a *E. coli*, ya que reconoce e interacciona con el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas (Bougarn *et al.*, 2010; Petzl *et al.*, 2018). Proteínas extracelulares como fibrinógeno, fibronectina y heparán sulfato se han asociado como ligandos endógenos responsables de la activación de TLR4 (Okamura *et al.*, 2001; Smiley *et al.*, 2001; Termeer *et al.*, 2002). Otros ligandos endógenos identificados fueron las β -defensinas y las proteínas de choque térmico (HSPs) (Asea *et al.*, 2002; Dybdahl *et al.*, 2002). Adicionalmente, TLR4 también reconoce derivados de plantas y moléculas no patogénicas (Nakaya *et al.*, 2004). Además de su expresión en células de la respuesta inflamatoria, TLR4 se expresa en CEM bovinas (Bougarn *et al.*, 2010).

1.2.1.4.2. Vías de señalización de los TLRs.

La interacción TLR (2 o 4)-ligando da lugar a la activación de diversas vías de señalización que inducen la activación de la proteína adaptadora de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), cuyo dominio TIR facilita el reclutamiento y activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), induciendo finalmente la activación de diversos factores de transcripción, como el factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B), la proteína de activación 1 (AP-1) y el factor de respuesta al interferón 3 (IRF3). Tanto NF κ B como AP-1 estimulan la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria (Abbas, 2012; Su *et al.*, 2012).

El factor de transcripción NF κ B es un dímero constituido por proteínas de la familia Rel, encargadas de activar la transcripción de los genes blanco de la vía. Presenta un dominio N-

terminal de homología rel (RHD), el cual es el responsable de la dimerización, de la asociación con el inhibidor I κ B y de la unión con los motivos κ B del ADN (Hoffmann *et al.*, 2006). El heterodímero NF κ Bp65/p50 es el más abundante en las células de mamíferos (Ghosh y Karin, 2002). En la mayoría de las células, la subunidad NF κ Bp50 se encuentra en el citosol en forma inactiva, debido a su interacción con la proteína inhibidora I κ B. En respuesta a un estímulo, se induce la degradación proteolítica de I κ B, provocando la activación y translocación de NF κ Bp65 al núcleo (Wei *et al.*, 2014a), en donde se une a la región promotora de los genes blanco regulando su transcripción (Mément, 2006; Hayden y Ghosh, 2008; Choi *et al.*, 2011). La activación de NF κ B conduce a la producción de las citoquinas TNF α , IL-1 β , IL-6 y el factor estimulante de colonias granulocitos/macrófagos (GM-CSF) (Brubaker *et al.*, 2015; Musilova *et al.*, 2019).

Se ha determinado que la expresión de citoquinas durante la inflamación de la GM bovina se correlaciona con la activación de NF κ B (Yang *et al.*, 2008; Lara-Zárate *et al.*, 2011). En forma concomitante, la señalización por TLR induce la expresión de moléculas coestimuladoras esenciales para la iniciación de la RI adaptativa, como CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), las cuales son proteínas de superficie expresadas por las células presentadoras de antígenos (CPA) (Dallard y Calvino, 2010). La presencia de estas moléculas coestimuladoras y la presentación de los componentes antigénicos microbianos activan las células T CD4⁺ requeridas para iniciar la RI adaptativa (Takeda y Akira, 2005).

1.2.1.4.3. Mecanismos microbicidas efectores.

La inflamación es un mecanismo crítico del sistema de defensa innato que intenta eliminar las bacterias dentro de la GM y ayudar en la reparación del daño tisular durante la invasión bacteriana, permitiendo la restauración de la función normal del tejido mamario. Un equilibrio dinámico entre citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β e IL-6) y antiinflamatorias (IL-2, IL-4 e IL-10) modula el estado de la inflamación, mientras que un desequilibrio o producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias puede conducir a enfermedades inflamatorias (Sordillo, 2018).

La fagocitosis es uno de los mecanismos efectores de la RI innata más importantes. La eliminación eficaz de patógenos a través de la fagocitosis requiere un rápido reclutamiento de células efectoras en el sitio de la infección (Moser y Leo, 2010). Luego de la interacción receptor-ligando, la membrana plasmática del fagocito comienza a redistribuirse y extiende una prolongación alrededor del patógeno, formando una vesícula llamada fagosoma, que luego se

fusiona con el lisosoma del fagocito dando lugar al fagolisosoma, lugar donde se darán los mecanismos microbicidas (Abbas, 2012).

Uno de los mecanismos microbicidas que ocurre en fagocitos activados es el estallido respiratorio. Luego de un estímulo, los fagocitos aumentan considerablemente la tasa de absorción de oxígeno produciendo una gran cantidad de ROS, entre ellas, superóxido y peróxido de hidrógeno, capaces de destruir a los microorganismos (Abbas, 2012; Thomas, 2017).

1.2.2. RI adaptativa.

La iniciación y la regulación de la RI adaptativa son fundamentales para la resolución de la infección. Si la bacteria invasora de la GM sobrevive, la infiltración de neutrófilos es reemplazada por linfocitos T y B. Los linfocitos pueden reconocer una amplia variedad de estructuras antigénicas a través de receptores específicos de membrana que definen la especificidad, diversidad, memoria y reconocimiento de lo propio y no propio del sistema inmune (Nickerson y Sordillo, 2017).

Los linfocitos T representan una subpoblación de células inmunes capaces de responder a un estímulo antigénico específico a través de su receptor TCR. Dependiendo de la expresión de marcadores de superficie, del tipo de citoquina secretada y de su función efectora los linfocitos T $\alpha\beta$ se dividen en Th o colaboradores ($CD4^+$) y T citotóxicos (Tc) ($CD8^+$) (Schukken *et al.*, 2011; Abbas, 2012).

Los linfocitos Th producen citoquinas en respuesta al reconocimiento de complejos antígeno-CMH-II en CPA. Cuando se activan, producen una gran variedad de citoquinas que tienen un rol fundamental en la activación de linfocitos T, B, macrófagos, neutrófilos y otras células que participan en la RI. Los diferentes patrones de citoquinas producidos por las células Th activadas orientan la RI hacia diferentes perfiles dando como resultado diferentes tipos de RI, cada uno con diferentes fenotipos de secreción de citoquinas que provocan características funcionales únicas (Sordillo, 2018). Así, por ejemplo, los linfocitos Th1 secretan principalmente IFN γ y TNF α y están involucrados en la respuesta frente a patógenos intracelulares. Los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13 y están involucrados en la respuesta frente a parásitos, helmintos y algunos patógenos extracelulares. Los linfocitos Th foliculares (Thf) se encuentran en los ganglios linfáticos en estrecha asociación con las células B y se caracterizan por la secreción de IL-21. Los Thf estimulan a los linfocitos B específicos para que secreten niveles elevados de anticuerpos. Los linfocitos Th17 secretan IL-17 e IL-22, y son fundamentales en la

respuesta frente a patógenos extracelulares (Moser y Leo, 2010). Dependiendo de la etapa de lactancia y la ubicación del tejido, los porcentajes de estas células pueden variar significativamente (Zhao *et al.*, 2015). Las subpoblaciones Th1 y Th17 son importantes frente a la infección por *S. aureus* (Milner *et al.*, 2008; Ishigame *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2014). Durante los estadios tempranos de la infección, células del sistema inmune innato del hospedador, macrófagos principalmente, producen citoquinas proinflamatorias (Buzás *et al.*, 2004). Este ambiente de citoquinas impulsa una respuesta protectora de tipo Th1 y Th17 por parte de linfocitos T CD4⁺ que, de manera exacerbada, puede resultar en un daño sustancial a los tejidos del hospedador.

Los linfocitos Tc poseen funciones tanto citotóxicas como supresoras. Son células capaces de inducir la muerte de células infectadas, dañadas o disfuncionales. Luego del reconocimiento del complejo antígeno-CMH-I, los linfocitos CD8⁺ secretan perforinas/granzimas que inician una respuesta apoptótica que conduce a la rápida muerte celular de la célula que expresa el antígeno (Moser y Leo, 2010). Se ha sugerido que las células T CD8⁺ pueden actuar como “depuradores” (*scavengers*) removiendo células secretoras viejas o dañadas, las cuales pueden incrementar la susceptibilidad de la GM a las infecciones (Sordillo, 2018).

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos contra patógenos invasores. Los linfocitos B reconocen antígenos específicos a través del receptor de membrana BCR (Abbas, 2012). De manera similar a los macrófagos y CDs, estos linfocitos pueden funcionar como CPA. Luego del reconocimiento, los linfocitos B internalizan, procesan y presentan el antígeno en el contexto CMH-II a los linfocitos Th. Estos linfocitos se activan y secretan IL-2, que a su vez induce la proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas que producen anticuerpos y células B de memoria. A diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B, permanecen constantes durante la lactancia (Sordillo, 2018).

1.3. Modulación de la RI.

Los avances tecnológicos en inmunología han proporcionado nuevas herramientas para el estudio de la inmunidad de la GM y la patogénesis de la mastitis (Sordillo y Streicher, 2002; Rainard y Riollot, 2006; Aitken *et al.*, 2011; Schukken *et al.*, 2011; Wellnitz y Bruckmaier, 2012).

La terapia antibiótica es en la actualidad uno de los pilares de los programas de control frente a ciertas enfermedades infecciosas, como la mastitis bovina. El fracaso frecuente del tratamiento con antibióticos para combatir las infecciones bacterianas y la recurrencia de estas

infecciones puede estar relacionado, entre varios factores, con la capacidad de *S. aureus* para invadir, evadir la RI y sobrevivir dentro de una amplia variedad de células eucariotas, como CEM, neutrófilos y macrófagos (Almeida *et al.*, 1996; Hébert *et al.*, 2000; Sinha y Fraunholz, 2010). Es por esto que, es necesario la búsqueda de enfoques alternativos para prevenir y controlar la mastitis bovina por *S. aureus* para complementar las prácticas actuales. La utilización de compuestos capaces de modular la RI podría ser una alternativa eficaz o un complemento a los métodos tradicionales de control de las IIM al momento de involución, como tratamiento preventivo.

La inmunomodulación implica la regulación, supresión o intensificación de la RI (Hu, 2002). La actividad de estos compuestos depende tanto de su mecanismo y sitio de acción como de la dosis y tiempo de administración (Tzianabos, 2000). Los modificadores de la RI (MRI) actúan a diferentes niveles del sistema inmune, inhibiendo o intensificando selectivamente poblaciones o subpoblaciones de células (Takahashi *et al.*, 2005).

Con respecto a los MRI intensificadores se pueden dividir en dos grupos principales: inmunoestimulantes (saponinas, agonistas de receptores *toll*, citoquinas) y agentes *delivery* (emulsiones, micropartículas, sales minerales) (O'Hagan, 2015). Los inmunoestimulantes estimulan a las CPA y promueven la secreción de varias citoquinas, mientras que los agentes *delivery* ayudan a preservar la conformación de los antígenos para una presentación adecuada a las CPA y de esa manera proporcionar una estimulación inmune lenta y sostenida (Burakova *et al.*, 2018).

1.3.1. *Panax ginseng* como MRI.

El *Panax ginseng* (*Pg*) es una planta de origen chino utilizada como medicina alternativa en todo el mundo, ya que participa en numerosos procesos biológicos, asociados con la presión arterial, el metabolismo y la función inmune (Zou *et al.*, 2013). En relación a los efectos en la RI, se encuentra reportado que *Pg* induce la proliferación de linfocitos, estimula la producción de citoquinas y mejora la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares humanos y de los leucocitos polimorfonucleares bovinos (Sun *et al.*, 2007). El extracto de *Pg* contiene diversos componentes farmacológicos como saponinas triterpenoides tetracíclicos (ginsenósidos), polisacáridos, péptidos, fitoesteroles, alcoholes poliacetilénicos y ácidos grasos (Kim *et al.*, 2005; Kang y Min, 2012; Park *et al.*, 2015). Particularmente, las saponinas o ginsenósidos, son consideradas su principal componente activo (Bi *et al.*, 2019).

Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado las habilidades inmunomodulatorias y efectos adyuvantes de *Pg* en GM bovina (Hu *et al.*, 2001, 2003; Sun *et al.*, 2007, 2009a; Baravalle *et al.*, 2010, 2011, 2015; Beccaria *et al.*, 2018). En mayor parte, sus efectos inmunomodulatorios son debido al efecto regulatorio en la producción de citoquinas y en la actividad fagocítica de macrófagos y CDs, así como en la activación de linfocitos T y B (Ho *et al.*, 2004; Tan y Vanitha, 2012).

En investigaciones *in vitro* realizadas por Hu *et al.* (1995) y Concha *et al.* (1996) se ha observado que el extracto de *Pg* estimula significativamente la actividad fagocítica y oxidativa de los neutrófilos así como también la capacidad proliferativa de linfocitos de sangre periférica y leche bovina. Recientemente, Beccaria *et al.* (2018) han demostrado que *Pg* indujo la expresión génica de TLR4 y NFκB y la expresión génica y proteica de las citoquinas IL-4 e IL-6 en células del epitelio alveolar mamario bovino (MAC-T). Además, en macrófagos aislados de secreción mamaria bovina, observaron que *Pg* indujo la expresión génica de TLR4, NFκB, IL-1β, IL-6, IL-8 y TNFα. Por otro lado, demostraron que el extracto de *Pg* redujo significativamente la internalización de dos cepas distintas de *S. aureus* en células MAC-T, sin influir en la capacidad fagocítica de macrófagos, ni en la funcionalidad de los mismos cuando estuvieron en contacto con *S. aureus*.

Estudios *in vivo* en bovinos han demostrado que la inoculación intramamaria de 3 mg/ml de un 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 involución, junto a un aumento en el RCS en leche, comportándose como un estimulante de las defensas innatas (Baravalle *et al.*, 2010, 2011). Sumado a sus propiedades como potenciador de la RI innata en la GM bovina, se ha demostrado que la aplicación intramamaria de *Pg*, estimuló la remodelación del tejido mamario, aumentando en forma significativa la apoptosis de las células epiteliales y estromales (Dallard *et al.*, 2011) y modificando la expresión génica y proteica de componentes de la familia del factor de crecimiento análogo a insulina (Dallard *et al.*, 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 aún 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). Además, se observó la activación de MyD88 y NFκB en el tejido mamario tratado con *Pg* (Baravalle *et al.*, 2015). Estos resultados contribuyen al conocimiento de los posibles mecanismos mediante los cuales *Pg* estimula la inmunidad innata durante la involución de la GM bovina.

En estudios realizados *in vivo* en ratones, Silvestrini *et al.* (2017) demostraron un efecto inmunoprotector del extracto de *Pg* frente a IIM experimentales por *S. aureus*. La inoculación intramamaria 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 NFκB, conduciendo al aumento en la expresión génica de las citoquinas IL-1α y TNFα. 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.

1.3.2. Ginsenosídeos.

Los ginsenosídeos son las moléculas claves responsables de los efectos farmacológicos e inmunológicos del *Pg* (Park *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018). Participan en numerosos procesos biológicos incluyendo procesos antioxidantes, antisenescentes, antitumorales, neuroprotectores, metabólicos, inflamatorios, inmunoestimulatorios, proliferativos y apoptóticos, entre otros (Song *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). Estos compuestos se encuentran distribuidos en diferentes partes de la planta de *Pg*, incluyendo raíz, hoja y baya (Gao *et al.*, 2020).

Químicamente, son glucósidos triterpenoides de dammarano (triterpeno tetracíclico presente en sapogeninas como el *Pg*) y se clasifican, según las posiciones de unión de los azúcares, en dos grupos. En el grupo de protopanaxadioles (PPD), los residuos de azúcar se unen al anillo de dammarano en la posición 3 (C3) mientras que el grupo de protopanaxatrioles (PPT), los residuos de azúcar se unen al anillo tetracíclico en la posición 6 (C6) (Sun *et al.*, 2007; He *et al.*, 2020). Se encuentran identificados cerca de 150 ginsenosídeos, siendo Rg1, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg3, Rh2, F1 y compuesto K (CK) los más estudiados hasta el momento (Mohanani *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2020).

Los ginsenosídeos tienen efectos adyuvantes en la RI en diferentes especies como vaca, cerdo, ratón y rata (Su *et al.*, 2015). Dicho efecto se debe a la estructura anfipática y a los grupos funcionales que presentan (Sun *et al.*, 2007). Estudios recientes han revelado que Rg1 es

la saponina que generó mayor actividad adyuvante en ratones (Qu *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2012, 2015).

1.3.2.1. Antecedentes sobre las propiedades inmunoestimulantes del ginsenósido Rg1.

De todos los ginsenósidos descubiertos hasta el momento, Rg1 es el más abundante del extracto de *Pg*, conformando entre el 0,37 - 0,5% del extracto de *Pg* (Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018).

Rg1 tiene importantes funciones tanto biológicas como inmunológicas. Participa en la regulación de la proliferación, diferenciación, envejecimiento y secreción de células madre hematopoyéticas, mesenquimales, neuronales y endoteliales, mediante múltiples mecanismos (He y Yu, 2016; He *et al.*, 2020). Además, Rg1 tiene importantes efectos terapéuticos en la reparación de tejidos, órganos dañados y envejecimiento (He y Yu, 2016).

Existe una gran cantidad de reportes que demuestran que la capacidad inmunomodulatoria y adyuvante de Rg1 está relacionada con la estimulación directa de la RI innata y adaptativa. En relación a la RI innata, varios autores coinciden que Rg1 ejerce su efecto inmunomodulatorio a través de la vía de TLR4 (Su *et al.*, 2012, 2015; Zhao *et al.*, 2014). Rg1 juega un papel fundamental en las respuestas inflamatorias mediadas por macrófagos a través de diferentes mecanismos, modulando las vías de señalización de NFκB o de Akt/mTOR. En macrófagos peritoneales murinos activados por LPS, Rg1 redujo los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de TNFα e IL-6, lo que podría ser una consecuencia de la activación disminuida de IκB y NFκB (Wang *et al.*, 2014). Además, Rg1 suprimió la expresión de ARNm y proteica de IL-6 al inhibir la vía de señalización de NFκB tanto en células RAW264.7 estimuladas con LPS como en macrófagos peritoneales de ratón, y suprimió la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), TNFα, IL-1β y NFκB en células microgliales BV-2 estimuladas con LPS (Kim *et al.*, 2017) y en macrófagos murinos estimulados con LPS (Su *et al.*, 2015). Más aún, en macrófagos polarizados M1 y microglías, el efecto antiinflamatorio de Rg1 fue demostrado mediante regulación negativa de la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNFα, IL-1β e IL-6) y de la expresión de enzimas (iNOS y COX-2) (Im, 2020). En un modelo experimental de hepatitis alcohólica en ratón, la sobreproducción de citoquinas inflamatorias fue suprimida por Rg1 en hígados intoxicados con alcohol. Además, Rg1 moduló la expresión del receptor de glucocorticoides (factor antiinflamatorio) a través de la vía del NFκB (Gao *et al.*, 2015a). Por otro lado, en un modelo de sepsis polimicrobiana inducida en ratones, se observó que el tratamiento con Rg1 mejoró la supervivencia de los animales mediante la inhibición de la respuesta inflamatoria (mediante disminución de TNFα, IL-6 e IL-10 y el

reclutamiento de neutrófilos en la cavidad peritoneal) y apoptosis de linfocitos (en bazo y timo de animales sépticos). Además, Rg1 mostró un rol protector en el *clearance* bacteriano (Zou *et al.*, 2013). Si bien estos reportes sugieren un perfil antiinflamatorio de Rg1, otros autores han demostrado el efecto proinflamatorio de este compuesto. En este sentido, Joo *et al.* (2005) y Huang *et al.* (2017) han probado que Rg1 estimuló la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) en microglías y CDs humanas derivadas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), respectivamente.

En relación a la RI adaptativa, tanto Rg1, como Re, Rb1, Rc y Rd son capaces de favorecer el desarrollo de las respuestas Th1 y Th2 (Qu *et al.*, 2011). En particular, Rg1 es capaz de modular la diferenciación Th1/Th2. En relación a esto, Yuan *et al.* (2016) estudiaron el efecto adyuvante de Rg1 en la RI contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en ratones. Rg1 fue capaz de estimular tanto la respuesta Th1 como la Th2, lo que estuvo fundamentado en la detección de anticuerpos de los isotipos IgG2b e IgG1 y en la expresión de ARNm de las citoquinas IFN γ e IL-4, respectivamente en ratones inmunizados con HBsAg. Por otro lado, Lee *et al.* (2004) mostraron que Rg1 induce el cambio en la RI de un perfil dominado por células Th1, debido a una disminución en la expresión de ARNm de IFN γ , a uno dominado por células Th2 en células T CD4⁺ purificadas.

1.3.2.2. Rg1 y mastitis.

Recientemente, Wang *et al.* (2019) evaluaron el efecto sistémico y terapéutico de Rg1 en un modelo experimental de mastitis causada por LPS en cabras lactantes. Los resultados mostraron que el tratamiento con Rg1 disminuyó la temperatura rectal, la temperatura de la piel de la ubre, la circunferencia de la ubre, el RCS en leche, los niveles de la N-acetil- β -d-glucosaminidasa y aumentó la producción de leche, lactosa y componentes sanguíneos recuperados como glóbulos blancos, neutrófilos, linfocitos, proteínas totales, albúmina y globulina.

Es importante mencionar que, a pesar de la gran cantidad de estudios que demuestran el efecto inmunomodulatorio y adyuvante de Rg1 en diferentes modelos experimentales, hasta el momento, no existen reportes acerca del rol de Rg1 en células bovinas. Es por ello, que en su conjunto, los antecedentes mencionados han despertado el interés por evaluar el potencial inmunomodulatorio de Rg1 con el fin de complementar y desarrollar tratamientos alternativos para la prevención y/o control de la mastitis bovina. Además, la evaluación de la capacidad adyuvante del ginsenósido Rg1 solo o en combinación con liposomas, que favorezcan la captura y presentación del antígeno, en un modelo experimental en ratones, permitirá evaluar posibles

asociaciones entre los adyuvantes estudiados. En este contexto, el desarrollo de un posible adyuvante en base a un compuesto inmunomodulador que promueva tanto la RI humoral como la celular será de utilidad para en un futuro diseñar y evaluar en bovinos inmunógenos contra mastitis causada por *S. aureus*.

1.3.3. Liposomas.

Los adyuvantes son moléculas, compuestos o complejos macromoleculares que estimulan, mantienen y potencian la RI específica frente a antígenos (García y De Sanctis, 2014). En general, actúan activando la RI innata y adaptativa, pero también son utilizados como depósito de antígeno, permitiendo así, la liberación lenta para lograr una presentación y estimulación prolongada del sistema inmune (Ho *et al.*, 2018). Además de aumentar la fuerza y la cinética de una RI, los adyuvantes también juegan un papel en la determinación del tipo de RI generada (Qu *et al.*, 2011).

Por su parte, los liposomas son vesículas fosfolipídicas, biocompatibles, que actúan como adyuvantes potenciando la RI, principalmente favoreciendo la captura del antígeno y su presentación. Estos compuestos son capaces de transportar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, haciendo posible el co-transporte de antígenos y moléculas inmunoestimulantes. Dentro de las propiedades principales que presentan estas partículas están la capacidad de simular a los patógenos (mediante el transporte de grandes cantidades de antígenos) a las CPA, la baja toxicidad y biodegradabilidad (Leserman, 2004). La RI resultante depende tanto de las características del antígeno como de las propiedades de los liposomas como composición, carga eléctrica, cantidad de capas y método de preparación (Reidel *et al.*, 2017).

En función a los antecedentes mencionados, la hipótesis general propuesta en esta tesis fue que el ginsenósido Rg1 ejerce una acción inmunomoduladora sobre células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) y células mononucleares de secreción mamaria (MSMC), induciendo la producción de citoquinas así como la activación de MSMC y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Además, Rg1 tiene un efecto adyuvante luego de la inmunización de ratones con formulaciones que contienen este compuesto en combinación con diferentes antígenos.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

El objetivo general de esta tesis fue *estudiar el potencial inmunomodulatorio del ginsenósido Rg1 en cultivos de células MAC-T y MSMC y evaluar su efecto sobre la activación de MSMC y PBMC. Asimismo, se propuso evaluar su capacidad adyuvante in vivo en ratones.*

2.2. Objetivos específicos.

Para llevar a cabo el objetivo final se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el potencial efecto inmunomodulatorio de Rg1 en MAC-T y en MSMC, mediante el estudio de la expresión de ARNm de TLRs y de citoquinas proinflamatorias.
- Evaluar el efecto de Rg1 en la expresión proteica de TLR2 y TLR4 en MSMC y PBMC.
- Evaluar el efecto de Rg1 en la activación de MSMC y PBMC mediante la determinación de la producción intracelular de ROS luego del co-cultivo de dichas células con *S. aureus*.
- Evaluar el efecto de Rg1 en la activación de MSMC y PBMC mediante el análisis de la expresión de CMH-II y CD80 en células CD14 positivas.
- Evaluar la RI humoral en ratones inoculados con distintas formulaciones adyuvantes, empleando albúmina sérica bovina (BSA) como antígeno modelo.
- Evaluar la RI humoral y celular producida y caracterizar el perfil de citoquinas inducido en ratones inoculados con distintas formulaciones adyuvantes, empleando un lisado de *S. aureus* como antígeno.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Evaluación del potencial inmunomodulatorio de Rg1 en células bovinas *in vitro*.

3.1.1. Reactivos empleados.

3.1.1.1. Ginsenosido Rg1.

Se utilizó el ginsenosido Rg1 proveniente de la firma *Biopurify Phytochemicals Ltd.* (Wenjiang Zone, Chengdu, Sichuan, China). Este compuesto se caracteriza por ser un polvo blanco, de elevada pureza (99,47 %) determinada por HPLC, cuya fórmula molecular es $C_{42}H_{72}O_{14}$ y su peso es 801,02 g/mol.

Los ensayos se llevaron a cabo a partir de una solución *stock* de 10 μ g Rg1/ml con buffer fosfato salino 1x (PBS), la cual fue esterilizada por filtración, controlada microbiológicamente y almacenada a -20°C hasta su uso.

3.1.1.2. Cultivos celulares.

3.1.1.2.1. Línea celular del epitelio alveolar mamario bovino.

Se utilizó la línea celular MAC-T (*Transformed mammary epithelial cells*) proveniente de células epiteliales alveolares mamarias bovinas transfectadas con el virus SV-40 (Huynh *et al.*, 1991). Las células MAC-T fueron cultivadas con medio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM, Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Internegocios) al 10% e inactivado por calor, insulina (5 μ g/ml), hidrocortisona (1 μ g/ml) y penicilina (100 U/ml) y sulfato de estreptomicina (100 μ g/ml) (ATB/AM) (Sigma Chemical Co.) a 37°C con 5 % de CO₂.

3.1.1.2.2. Células mononucleares aisladas de secreción mamaria bovina.

Las muestras de secreción mamaria provenientes de vacas Holstein, fueron tomadas de cuartos libres de IIM a los 10-14 días luego de la interrupción de la lactancia (secado). Los animales seleccionados pertenecen a los tambos experimentales de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja (EAGG) perteneciente a la UNL (Esperanza, Santa Fe) y de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) (INTA, Rafaela, Santa Fe). Para la toma de muestras de secreción mamaria, seis meses previos a la fecha probable de secado y a partir de los datos

arrojados por el control lechero de cada establecimiento, se seleccionaron los animales con RCS menores a 100.000 cél/ml. Luego, se tomaron muestras de leche de cada cuarto mamario mensualmente para la realización de análisis bacteriológicos por metodología estándar (Oliver *et al.*, 2004). 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. Las muestras fueron refrigeradas hasta su traslado al laboratorio. Las muestras de leche fueron sembradas, en forma de estría, en placas de agar sangre e incubadas 37°C. Luego de 24 - 48 hs de incubación, se observó la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas. Aquellos cuartos mamarios con al menos 3 muestreos consecutivos negativos antes del secado fueron considerados cuartos libres de IIM y utilizados para el aislamiento de MSMC. Asimismo, para descartar la presencia de patógenos en las muestras de secreción mamaria al día 14 del secado, una alícuota de las mismas fue sembrada e incubada por 24 - 48 hs en placas de agar sangre. Todos los animales muestreados se encontraban entre la segunda y tercera lactancia.

El aislamiento de las MSMC se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Renna *et al.* (2014). Aproximadamente, 25 ml de secreción mamaria (diluidos 1/2 con PBS 1x estéril) fueron centrifugados a 400 g durante 10 min y a 4°C. La capa de grasa, característica de la secreción en este periodo de involución de la GM, fue removida y el *pellet* de células resultante fue lavado con PBS 1x. Posteriormente, las células mononucleares fueron aisladas mediante gradiente de densidad (Histopaque 1,083 g/ml, Sigma) durante 30 min a 400 g y temperatura ambiente (TA). Luego, la monocapa de células fue cuidadosamente recolectada y las MSMC fueron lavadas con PBS 1x. Previo a la determinación de viabilidad con azul de tripán, las células fueron resuspendidas con medio RPMI (Gibco BRL) + SFB 10% + ATB/AM 1x y cultivadas en placas de 96 y/o 24 pocillos, dependiendo del ensayo. Pasadas 2 hs de incubación a 37°C y 5% CO₂, las MSMC plaqueadas fueron lavadas con PBS 1X para eliminar células no adheridas y limpiar restos celulares y remanentes de grasa y resuspendidas en medio RPMI + SFB 10% + ATB/AM 1x hasta el momento de su uso.

3.1.1.2.3. Cultivo primario de leucocitos totales aislados de sangre periférica bovina.

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena mamaria craneal de la GM de vacas *Holstein* libres de IIM provenientes de la EAGG (UNL).

Los leucocitos totales de sangre periférica fueron aislados siguiendo la metodología previamente descrita por Su *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, 30 ml de sangre anticoagulada fueron centrifugados a 2000 rpm durante 15 min y a 4 °C. Luego, el

plasma fue eliminado y el *pellet* celular resuspendido en buffer de lisis (0,15 M NH₄Cl, 1mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA disódica) hasta completar 50 ml, con el fin de lograr la lisis completa de los glóbulos rojos. Luego de 10 min de incubación a 4 °C, las células fueron centrifugadas a 1800 rpm durante 5 min y el *pellet* celular fue nuevamente resuspendido en 10 ml de buffer de lisis durante 5 min a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación, se detuvo la lisis celular agregando PBS 1x hasta completar los 50 ml y las células fueron centrifugadas y lavadas una vez más. Luego de determinar la viabilidad con azul de tripán, los leucocitos fueron resuspendidos con medio RPMI + SFB 10% + ATB/AM 1x y cultivados en placas de 96 y/o 24 pocillos, dependiendo del ensayo.

3.1.2. Evaluación del efecto de Rg1 en la viabilidad de células bovinas mediante XTT.

El efecto citotóxico de Rg1 en células MAC-T, MSMC y en leucocitos de sangre periférica se evaluó empleando el kit *Cell Proliferation Kit II* (XTT) (Roche). El kit se basa en la conversión del compuesto XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) en formazán, un producto altamente soluble en agua. Esta conversión es llevada a cabo por las enzimas mitocondriales en células metabólicamente activas. La cantidad de producto generado (de color naranja) es proporcional a la cantidad de células vivas, lo cual puede cuantificarse a través de la medición de la absorbancia a 450 nm.

En primera instancia se evaluó la viabilidad de las células MAC-T, las cuales fueron sembradas en placas de 96 pocillos (2x10⁵ cél/ml) y luego tratadas con 0, 10, 20, 50 y 100 µg/ml de Rg1 durante 2, 8 y 24 hs. Pasados los tiempos de incubación establecidos, se les adicionó una mezcla de los reactivos *XTT Labeling* y *electron-coupling* en una concentración final de 0,3 mg/ml por pocillo, según las indicaciones del kit. Luego de 2 hs, se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro (Microplate Reader, SPECTROstar^{Nano}, BGM/LABTECH).

En segunda instancia, se evaluó la viabilidad de MSMC y leucocitos de sangre periférica. Considerando los resultados obtenidos en las células MAC-T, se seleccionaron las dosis de 0 y 250 µg/ml de Rg1 para tratar a las células (1x10⁶ cél/pocillo) durante 24 hs y luego realizar el ensayo de XTT de la misma forma que la detallada anteriormente para las células MAC-T.

Los valores de absorbancia fueron medidos como densidad óptica (DO). Cada condición evaluada se realizó por triplicado y se llevaron a cabo tres ensayos de manera independiente para cada tipo celular en estudio.

3.1.3. Evaluación del efecto de Rg1 en la expresión génica de componentes de la inmunidad innata en células MAC-T y MSMC mediante PCR en tiempo real.

3.1.3.1. Diseño experimental.

Con el objetivo de caracterizar la RI innata inducida luego del tratamiento con Rg1 tanto en células MAC-T como en MSMC, se evaluó la expresión de ARNm de ciertos componentes de la inmunidad innata mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Las células MAC-T (2×10^5 cél/ml) fueron sembradas en placas de 24 pocillos y tratadas con 0, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1 durante 2, 6 y 24 hs, mientras que, las MSMC (2×10^6 cél/ml) fueron tratadas con 0, 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1 durante 2, 8 y 24 hs. Pasados los tiempos de tratamiento con Rg1 establecidos, tanto las células MAC-T como las MSMC adheridas fueron tratadas con Trizol para la extracción de ARN y realización de qPCR. Cada condición evaluada se realizó por triplicado y se llevaron a cabo tres ensayos de manera independiente para cada tipo celular en estudio.

3.1.3.2. Extracción de ARN.

La extracción de ARN total de las células MAC-T y MSMC tratadas con diferentes concentraciones de Rg1, se realizó mediante la metodología de extracción con Trizol® LS Reagent (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific) utilizando 3 pocillos de células para 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™ Coprecipitant (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific). Luego de la extracción, se evaluó la integridad, pureza y concentración de ARN mediante espectrofotometría (SPECTROstar^{Nano}) y las muestras se conservaron a -80°C hasta la realización de la transcripción reversa (RT).

3.1.3.3. Obtención de ADN copia mediante RT.

En primer lugar, el ARN fue tratado con desoxirribonucleasa (DNAsa) a los efectos de eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico y luego se llevó a cabo la retrotranscripción del ARN extraído a ADN copia (ADNc) mediante la reacción de RT.

Para el tratamiento con DNAsa, la composición final del medio de reacción fue: ARN (cantidad constante de 2 µg), buffer de la enzima DNAsa I (2 µl), enzima DNAsa I (2 µl) (Productos Bio-Lógicos, PBL) y agua DEPC (0,1 %), en cantidad suficiente para completar un volumen final de reacción de 20 µl. La 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 (2 µg, previamente tratado con DNAsa) a la mezcla de reacción conteniendo cebadores hexanucleótidos con secuencia al azar (1 µg/µl), desoxirribonucleótidos (dNTPs, 25 mM), buffer de reacción para la enzima MMLV (5x First Strand Buffer), ditioneitol (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 ThermoFisher Scientific. Las reacciones se realizaron en un termociclador de punto final (TECHNE TC-312) 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. Finalmente, los ADNc obtenidos fueron cuantificados por espectrofotometría y luego conservados a -20°C hasta su posterior utilización.

3.1.3.4. Diseño de cebadores específicos para TLR2, TLR4, NFκB, IL-1β, IL-6, TNFα e IL-8 bovinos.

Para evaluar los niveles de expresión de ARNm de los receptores de la inmunidad innata y de las citoquinas bovinas se diseñaron cebadores específicos para los genes que codifican para dichas proteínas. Estos cebadores fueron diseñados *on-line* empleando la página *Integrated DNA Technologies* y la herramienta para dicho diseño propuesta en *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), *Primer Designing Tool*.

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.

Tabla 1: Cebadores específicos para los diferentes genes evaluados.

| Cebador | Secuencia cebador 5' - 3' | Nº acceso NCBI | Tamaño amplicón (pb) | Ta (°C) |
|----------|---|----------------|----------------------|---------|
| TLR2 | S: CGATGACTACCGCTGTGACTC AS: CCTTCCTGGGCTTCCTCTT | NM_174197.2 | 224 | 58 |
| TLR4 | S: AGCTTCAACCGTATCATGGCCTCT AS: ACTAAGCACTGGCATGTCCTCCAT | AY634630 | 213 | 58 |
| NFκB | A: GCTGAGTTGAGAGAGAGTAACC AS: CTTTCTGTTGTCACCTGCTGC | NM001076409.1 | 111 | 62 |
| IL-1β | S: AGTCTGTCTGTACCCTAAC AS: GAGAGGGTTTCCATTCTGAAG | NM_174093.1 | 113 | 61 |
| IL-6 | A: GATGCAGTCTTCAAACGAGTGGGT AS: AGGTTTCTGACCAGAGGAGGGAAT | X57317 | 163 | 56 |
| TNFα | A: GCTTTACCTCATCTACTCACAG AS: CTTGATGGCAGACAGGATG | EU276079.1 | 133 | 62 |
| IL-8 | S: ACACATTCCACACCTTTC AS: CTTGCTTCTCAGCTCTCTTC | AF232704.1 | 184 | 60 |
| β-actina | A: CGGAACCGCTCATTGCC AS: ACCCACACTGTGCCCATCTA | BT030480.1 | 290 | 60 |

Referencias: S: sentido; AS: antisentido; pb: pares de bases.

3.1.3.5. Reacción de qPCR.

Para analizar la expresión de los ARNm de cada uno de los tipos celulares tratados con las diferentes concentraciones de Rg1 en diferentes horarios, se utilizó un protocolo de qPCR estandarizado utilizando SYBR Green I (ThermoFisher Scientific) (Pfaffl, 2001).

En primera instancia, se realizaron las curvas estándares correspondientes a cada uno de los genes a analizar, con el fin de definir la eficacia de cada cebador. Estas curvas se construyeron a partir de ADNc proveniente de un *pool* de células aisladas de secreción mamaria. Se realizaron diluciones seriadas del ADNc, por duplicado, las cuales fueron corridas en el termociclador de tiempo real *StepOne* (Applied Biosystems, Life Technology). 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 de la reacción. También se determinó el umbral (*threshold*), el rango dinámico y la concentración de ADNc más apropiada para llevar a cabo la cuantificación de las muestras.

Una vez obtenidas las curvas estándares, se evaluó la expresión de ARNm de las células MAC-T y MSMC tratadas con Rg1. Cada reacción de qPCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 4 µl de ADNc y 16 µl de una mezcla de reacción: buffer Phire 5x, MgCl₂ (50

mM), dNTPs (25 mM), cebador sentido (20 μ M), cebador antisentido (20 μ M), *SYBR Green I* y ADN Polimerasa *Phire Hot Start II* (ThermoFisher Scientific), llevando a volumen con agua DEPC. Todas las muestras se corrieron por duplicado. 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 (omitiendo ADNc). Las condiciones correspondientes a ensayar para cada gen se detallan a continuación:

→ Desnaturalización inicial (1 ciclo): 98°C / 3 min.

→ Desnaturalización (1 ciclo): 98°C / 5 seg.

→ Hibridación (40 ciclos): » TLR2: 58°C / 20 seg.

» TLR4: 58°C / 15 seg.

» NF κ B: 62°C / 30 seg.

» IL-1 β : 61°C / 30 seg.

» IL-6: 56°C / 15 seg.

» TNF α : 62°C / 25 seg.

» IL-8: 60°C / 25 seg.

» β -actina: 60°C / 15 seg.

» Extensión y lectura (40 ciclos): 72°C / 20 seg.

Una vez finalizada la reacción de amplificación, se realizaron las curvas de disociación de cada amplicón para confirmar la pureza de los productos. Finalmente, para comprobar la identidad de los productos de qPCR obtenidos para cada gen en estudio, una partida de los mismos fue enviada a secuenciar al Servicio de Secuenciación de Macrogen (Seúl, Corea). Tanto los cebadores como los productos recibidos fueron cotejados con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) empleando el BLAST.

La cuantificación de las muestras se realizó utilizando el método de Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) empleando el gen de la β -actina como normalizador (Livak y Schmittgen, 2001; Joo *et al.*, 2005; Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014).

3.1.4. Evaluación del efecto de Rg1 en la expresión proteica de TLR2 y TLR4 en MSMC y PBMC mediante citometría de flujo (CF).

3.1.4.1. Diseño experimental.

Siguiendo la metodología detallada anteriormente (puntos 3.1.1.2.2 y 3.1.1.2.3), las células aisladas de secreción mamaria y sangre periférica bovina (2×10^6 cél/ml) fueron sembradas en placas de 24 pocillos y tratadas con Rg1 (250 $\mu\text{g/ml}$) o medio de cultivo (células basales). Para este ensayo, además, se utilizaron LTA (Sigma) (2,5 $\mu\text{g/ml}$) y LPS (Sigma) (2,5 $\mu\text{g/ml}$) como ligandos específicos para TLR2 y TLR4, respectivamente (como controles positivos de estimulación). Las concentraciones de LPS y LTA utilizadas para la estimulación de las células fueron puestas a punto en ensayos previos de dosis-respuesta. Luego de 24 hs de incubación a 37°C y 5% CO₂, las células fueron tripsinizadas (Tripsina TRANS, AP Biotech), lavadas con buffer de citometría (PBS 1x + EDTA 5 mM + SFB 3%) e incubadas con los anticuerpos *anti-bovine* TLR2-A467 (Alexa Fluor 647) (1/25, Bio-Rad) y *anti-human* TLR4-A488 (Alexa Fluor 488) (1/10, Bio-Rad) durante 30 min, en hielo y al abrigo de la luz. Ambos anticuerpos fueron previamente titulados con el fin de trabajar con la dilución óptima. Los anticuerpos empleados se encuentran detallados en el Anexo I. Finalmente, las células fueron lavadas con buffer de citometría, resuspendidas en fluido de enfoque y adquiridas en el citómetro de flujo *Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer* A24860 (Life Technology). Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado y de manera independiente para cada tipo celular en estudio.

3.1.4.2. Estrategia de selección de las poblaciones de interés.

Los archivos obtenidos luego de la adquisición de las células, fueron analizados empleando el *software FlowJo* (TreeStar Inc., Ashland, USA). La estrategia de selección o *gating* de las poblaciones celulares de interés (MSMC y PBMC) empleada para el análisis de la expresión proteica de los receptores se detalla a continuación. A partir de un gráfico *dot plot* de tamaño (*forward scatter*, FSC), donde se representó altura (FSC-H) vs. área (FSC-A), se seleccionaron los singletes o eventos individuales (R1) (Figura 1A). Dentro de R1, teniendo en cuenta los parámetros de FSC vs. complejidad citoplasmática (*side scatter*, SSC), se seleccionó la población de células mononucleares (MSMC o PBMC, R2) (Figura 1B). Finalmente, el porcentaje de expresión de TLR2 o TLR4 en MSMC o PBMC (R2) se evaluó en un gráfico *dot plot* de TLR2 (Alexa Fluor 467) vs. TLR4 (Alexa Fluor 488) (Figura 1C).

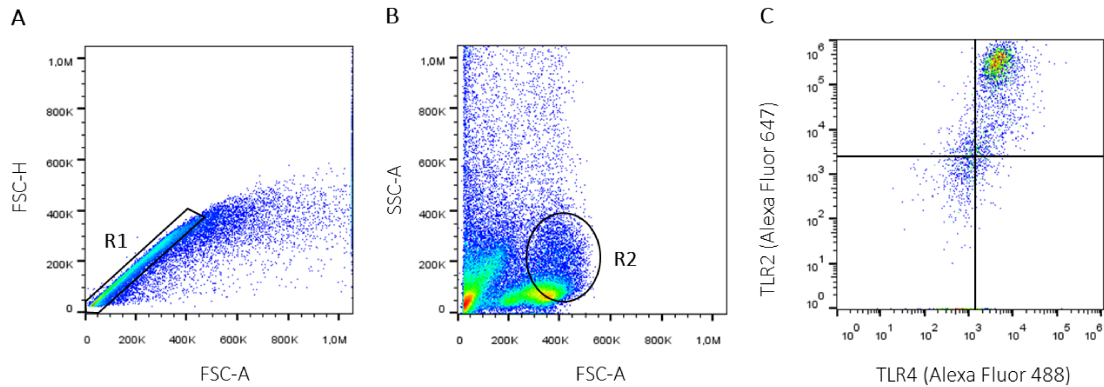


Figura 1. Gráficos representativos de la estrategia de selección de las poblaciones de interés para el análisis de la expresión de TLR2 y TLR4 en células mononucleares de secreción mamaria y sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente). A) Gráfico dot plot de la selección de singletes (R1). B) Gráfico dot plot de la selección de población de células mononucleares (R2). C) Gráfico dot plot para el análisis de la expresión de TLR2 y TLR4 en R2.

3.1.5. Evaluación del efecto de RgI en la producción intracelular de ROS en MSCM y PBMC mediante CF.

3.1.5.1. Caracterización y cultivo de la cepa 5011 de *S. aureus*.

La cepa 5011 de *S. aureus* fue aislada y caracterizada por nuestro grupo de investigación a partir de una muestra de leche proveniente de una vaca Holando Argentino, con mastitis subclínica, perteneciente a un rodeo lechero ubicado en la provincia de Santa Fe (Argentina). Esta cepa fue aislada de un mismo cuarto mamario, en seis muestreos mensuales consecutivos durante una lactancia, y fue posteriormente caracterizada como una cepa altamente adaptada a la GM bovina, considerándose una cepa con capacidad de generar infecciones persistentes (Camussone *et al.*, 2014).

El cultivo bacteriano se preparó a partir de un vial de la cepa 5011 de *S. aureus* conservada en caldo tripteína soya (TSB, Britania) y glicerol a -80°C. Se realizó un repique fresco en agar base (Britania) y se dejó crecer durante 24 hs a 37°C. Al día siguiente, se tomaron 3 colonias aisladas de la placa, se resuspendieron en 5 ml de TSB y se incubaron durante 16 hs a 37°C y agitación suave (150 rpm). Luego, 50 µl de dicha suspensión se añadieron a 5 ml de TSB y se incubaron durante 2 hs a 37°C y agitación suave (Sacco *et al.*, 2020).

3.1.5.2. Marcación de la cepa 5011 de *S. aureus* con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

La marcación de la cepa 5011 de *S. aureus* con FITC se realizó siguiendo la metodología descrita por Beccaria *et al.* (2018). Brevemente, las bacterias crecidas luego del cultivo de 2 hs (1×10^9 unidades formadoras de colonias, UFC) fueron centrifugadas y lavadas con PBS 1x. El *pellet* bacteriano fue resuspendido en 990 μ l de PBS 1x y 10 μ l de FITC (10 mg/ml). Dicha suspensión fue incubada durante 1 h a TA, agitación suave y al abrigo de la luz. Luego de la incubación, las bacterias teñidas fueron exhaustivamente lavadas y adquiridas en el citómetro para evaluar la eficiencia de la tinción. Finalmente, la suspensión bacteriana fue centrifugada y el *pellet* conservado a -20°C hasta su utilización.

3.1.5.3. Ensayo de fagocitosis de *S. aureus* por MSMC y PBMC y determinación de la producción de ROS.

La evaluación del efecto de Rg1 en la activación y producción de ROS de células mononucleares se realizó mediante CF. Para ello, las células aisladas de secreción mamaria y sangre periférica bovina (2×10^6 cél/ml) fueron sembradas en placas de 24 pocillos y tratadas con Rg1 (250 μ g/ml) o medio (células basales). Luego de 24 hs de incubación, el sobrenadante de cada pocillo fue eliminado y las células fueron lavadas y co-cultivadas con la cepa 5011 de *S. aureus* marcada con FITC, en una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula (Beccaria *et al.*, 2018). En este ensayo, se utilizó forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma) (50 ng/ml) como control positivo para la producción de ROS. Luego de 1 h de incubación, se detuvo la interacción entre bacterias y células con una solución de NaCl 0,85% + EDTA 0,04%.

Es importante mencionar que, si bien se planteó evaluar el efecto de Rg1 en la capacidad fagocítica de células bovinas, en el presente trabajo se evaluó la “adherencia e internalización” de las bacterias en las células bovinas, debido a que no se realizó el *quenching* o apagado de la fluorescencia emitida por FITC en las bacterias que quedaron adheridas a las células bovinas. Por lo tanto, la fluorescencia detectada por el citómetro no corresponde solo a bacterias FITC⁺ internalizadas, sino también a las bacterias FITC⁺ adheridas a la superficie celular.

Luego del co-cultivo de células aisladas de secreción mamaria y sangre periférica bovina con *S. aureus*, las células eucariotas fueron tripsinizadas, lavadas e incubadas con hidroetidina (HE, Molecular Probes, Invitrogen) (1 μ M) durante 15 min a 37°C y al abrigo de la luz, para evaluar la producción de ROS intracelular (Beccaria *et al.*, 2018). Brevemente, la HE es permeable a las células y en presencia de ROS (principalmente el anión superóxido), es oxidada a etidio, el cual se intercala en el ADN de las células y emite fluorescencia, que es detectada por el citómetro de flujo.

Finalmente, las células fueron lavadas con buffer de citometría, resuspendidas en fluido de enfoque y adquiridas en el citómetro de flujo. Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado y de manera independiente para cada tipo celular en estudio.

3.1.5.4. Estrategia de *gating*.

La estrategia de *gating* para el análisis del porcentaje de adherencia e internalización de *S. aureus* y producción de ROS se realizó de manera similar a la descrita en el punto 3.1.4.2. Es decir, en un *dot plot* de FSC-H vs. FSC-A, se seleccionaron los singletes o eventos únicos (R1) (Figura 2 A) y en R1 se seleccionó la población de células mononucleares (MSMC o PBMC) teniendo en cuenta los parámetros de tamaño y complejidad (R2) (Figura 2 B). El porcentaje de MSMC y PBMC que tuvieron al menos una bacteria asociada (adherida y/o internalizada) y que produjeron ROS se evaluó en un *dot plot* de FITC (*S. aureus*) vs. HE (Figura 2 C).

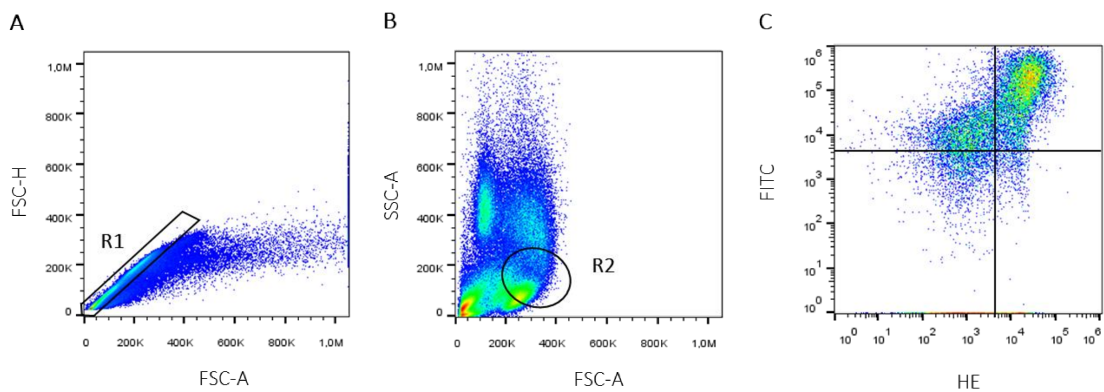


Figura 2. Gráficos representativos de la estrategia de selección de las poblaciones de interés para el análisis de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células mononucleares de secreción mamaria y sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente) FITC⁺. A) Gráfico *dot plot* de la selección de singletes (R1). B) Gráfico *dot plot* de la selección de población de células mononucleares (R2). C) Gráfico *dot plot* de FITC vs. HE para evaluar el porcentaje de ROS producido por MSMC y PBMC con al menos una bacteria adherida y/o internalizada (células FITC⁺).

3.1.6. Evaluación del efecto de Rg1 en la expresión de CMH-II y CD80 en MSCM y PBMC mediante CF.

3.1.6.1. Diseño experimental.

Para evaluar el efecto de Rg1 en la activación de células bovinas, se evaluó la expresión de las moléculas CMH-II y CD80 en células CD14⁺. El CD14 es el marcador de superficie característico de monocitos/macrófagos (Hussen *et al.*, 2013), mientras que las moléculas CMH-II y CD80 juegan un rol esencial en la activación de estas células haciéndolas más eficientes para presentar antígenos a los linfocitos T e inducir la RI adaptativa (Thompson-Crispi *et al.*, 2014; Holdsworth y Can, 2015).

De igual manera que en ensayos anteriores (puntos 3.1.3.1 y 3.1.4.1), las células aisladas de secreción mamaria y sangre periférica bovina (2x10⁶ cél/ml) fueron sembradas en placas de 24 pocillos y tratadas con Rg1 (250 µg/ml) o medio (células basales). Como controles positivos de activación se utilizaron LTA (2,5 µg/ml) y LPS (2,5 µg/ml). Luego de 24 hs de incubación, las células fueron tripsinizadas, lavadas e incubadas en PBS 1x + SFB 10% durante 30 min a 4°C para el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos. Luego de un lavado con buffer de citometría, las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-*human* CD14-allofocianina (APC) (1/200, Biolegend), anti-*bovine* MHC-II-FITC (1/100, Bio-Rad) y anti-*bovine* CD80-ficoeritrina (PE) (1/50, Bio-Rad) durante 30 min, a 4°C y al abrigo de la luz. Los anticuerpos empleados se encuentran detallados en el Anexo I. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente, resuspendidas en fluido de enfoque y adquiridas en el citómetro de flujo. Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado y de manera independiente para cada tipo celular en estudio.

3.1.6.2. Estrategia de *gating*.

La estrategia de *gating* para el análisis de la activación celular fue similar a la descrita en el punto 3.1.4.2. En un gráfico *dot plot* de FSC-H vs. FSC-A se seleccionaron los singletes o eventos únicos (R1) (Figura 3 A). En la población de singletes (R1) y considerando los parámetros de FSC vs. SSC, se seleccionó la población de células mononucleares (MSMC o PBMC, R2) (Figura 3 B). En R2, la población de macrófagos o monocitos fue identificada como CD14⁺ utilizando un histograma (R3) (Figura 3 C). En la población CD14⁺ (R3) se analizó el porcentaje de expresión de CMH-II y CD80 utilizando un gráfico *dot plot* CMH-II (FITC) vs. CD80 (PE) (Figura 3 D).

Luego del tratamiento de las MSCM y PBMC con Rg1, se evaluó el porcentaje de células mononucleares que expresan CD14 (macrófagos o monocitos) y el porcentaje de estas células que expresan ambos marcadores de activación, CMH-II y CD80.

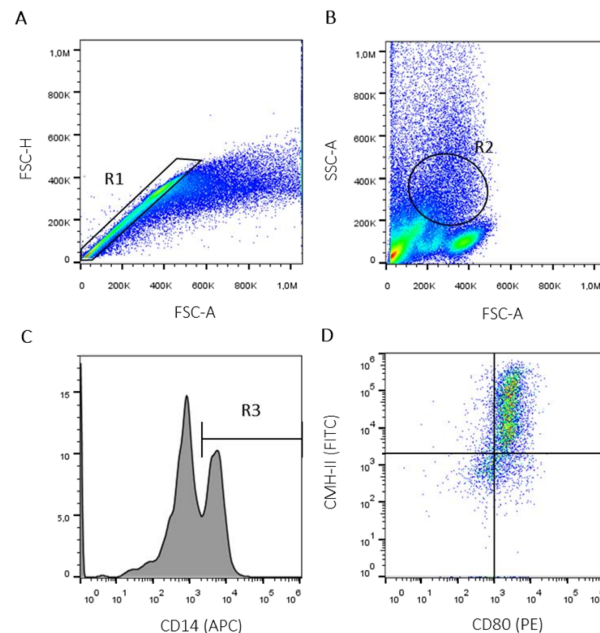


Figura 3. Gráficos representativos de la estrategia de selección de las poblaciones de interés para el análisis de la expresión de CMH-II y CD80 en células mononucleares de secreción mamaria y de sangre periférica (MSCM y PBMC, respectivamente). A) Gráfico dot plot de la selección de singletes (R1). B) Gráfico dot plot de la selección de células mononucleares (R2). C) Histograma de la población de células CD14⁺ (monocitos/macrófagos). D) Gráfico dot plot para el análisis de la expresión de CMH-II y CD80 en macrófagos y monocitos (CD14⁺).

3.1.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para todas las técnicas empleadas en los ensayos *in vitro* fueron expresados como la media de los valores obtenidos \pm error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software *IBM SPSS Statistic 22* para *Windows*. Luego de verificar la normalidad y homogeneidad de los datos con los tests de Kolmogorov-Sminrov y Levene, respectivamente, se analizaron las diferencias entre los grupos experimentales empleando diferentes tests estadísticos dependiendo de los ensayos. Para el caso de los ensayos de viabilidad en células MAC-T y de qPCR en células MAC-T y de secreción, el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía,

seguido del *test* de Duncan como prueba de comparación múltiple. Para el resto de los ensayos, el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el *test t-Student* para determinar diferencias entre células estimuladas con Rg1 y células basales o controles. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos y valores $0,05 < p < 0,10$ fueron considerados tendencia.

Es importante aclarar que los datos obtenidos de las células estimuladas con LTA, LPS o PMA (controles positivos) según la técnica empleada, no fueron considerados para el análisis estadístico de los resultados, pero si fueron graficados con el objetivo de demostrar el funcionamiento de los ensayos independientemente de los resultados obtenidos con Rg1.

3.2. Evaluación de la capacidad adyuvante de Rg1 en un modelo murino *in vivo*.

3.2.1. Reactivos y formulaciones empleados en las inmunizaciones.

3.2.1.1. Antígenos.

3.2.1.1.1. Albúmina sérica bovina.

Para las inmunizaciones realizadas en los ensayos 1 y 2 se utilizó como antígeno modelo albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich).

3.2.1.1.2. Lisado de la cepa 5011 de *S. aureus*.

Para las inmunizaciones realizadas en los ensayos 3 y 4 se utilizó como antígeno un lisado bacteriano de la cepa 5011 de *S. aureus*. El lisado bacteriano se preparó a partir de un cultivo líquido de la cepa 5011 de *S. aureus* (punto 3.1.5.1). Luego de 2 hs de crecimiento, la suspensión fue centrifugada a 12.000 rpm durante 10 min. El *pellet* bacteriano fue resuspendido en 10 ml de PBS 1x estéril y se añadieron 35 unidades internacionales (UI) de lisostafina (Sigma-Aldrich). Esta enzima, con actividad hexoaminidasa, amidasa y endopeptidasa, cliva estructuras presentes en la pared celular del género *Staphylococcus*, provocando la lisis de las bacterias. La suspensión se incubó a 37°C y en agitación suave durante 90 min aproximadamente, hasta observar que la suspensión bacteriana se tornó transparente.

Finalmente, la enzima fue inactivada a 75°C durante 15 minutos (Camussone *et al.*, 2014). La suspensión bacteriana obtenida fue filtrada (45 µm) para asegurar la remoción total de las bacterias intactas y el contenido proteico fue cuantificado con el método colorimétrico (DC Protein Assay, Bio-Rad).

3.2.1.2. Formulaciones adyuvantes.

3.2.1.2.1. Ginsenosido Rg1.

Para la realización de los ensayos 1, 2 y 4 se utilizó el ginsenosido Rg1 descrito en el punto 3.1.1.1. Las diferentes formulaciones fueron preparadas a partir de una solución stock de 10 µg Rg1/ml con PBS 1x estéril. Dicha solución fue esterilizada por filtración, controlada microbiológicamente y almacenada a -20°C hasta su uso. Para descartar la presencia de endotoxinas, la solución stock de Rg1 fue testeada utilizando un kit comercial de lisado de amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod) siguiendo la metodología empleada en trabajos previos (Baravalle *et al.*, 2015). De esta manera, se asegura que la respuesta observada en los grupos inmunizados con Rg1 se deba al compuesto en estudio y no a posibles contaminaciones con endotoxinas bacterianas (Cooper y Pearson, 1977).

Para el ensayo 3 se utilizó el ginsenosido Rg1 (C₄₂H₇₂O₁₄) proveniente de la firma *Toronto Research Chemicals*. El compuesto se caracteriza por ser un polvo blanco, de elevada pureza (98%), cuya fórmula molecular es C₄₂H₇₂O₁₄ y su peso es 801,02 g/mol. En este caso, las formulaciones con Rg1 se llevaron a cabo a partir de una solución stock de 25 mg Rg1/ml con dimetilsulfóxido (DMSO). Dicha solución fue esterilizada por filtración, alícuotada y almacenada a -20°C hasta su utilización.

3.2.1.2.2. Liposomas multilaminares empleados en las inmunizaciones.

Para la realización de los ensayos 2, 3 y 4 se utilizaron liposomas catiónicos multilaminares como adyuvantes en las distintas formulaciones inoculadas. Los liposomas han sido preparados y cedidos por el equipo de la Dra. Carolina Veaute del Laboratorio de Inmunología Experimental de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL.

Dichos liposomas fueron producidos mediante el método de inyección etanólica, el cual consiste en la incorporación por inyección de la fase orgánica, en una proporción 1:9 (v/v), a la fase acuosa que se encuentra en agitación, generando de esta manera, liposomas oligolaminares. Para la conformación de la fase orgánica se utilizó dipalmitoilfosfatidil colina

(DPPC), colesterol (Chol) y estearilamina (SA), en una relación molar 7:2:2. Estos lípidos fueron disueltos en una mezcla de etanol/isopropanol (1:1 v/v). Para la conformación de la fase acuosa se utilizó buffer acetato (50 mM, pH = 4,3). Una vez obtenidas las vesículas lipídicas, se determinó el tamaño y diámetro promedio de las partículas mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Los resultados obtenidos por la técnica de DLS e informados por el Laboratorio de la Dra. Veaute mostraron una población homogénea en relación al tamaño de las vesículas.

Una vez obtenidos los liposomas, se evaluó su estabilidad cuando se los combinó con Rg1 y/o BSA. En una placa de 96 pocillos se distribuyeron alícuotas de dos concentraciones de liposomas (2 y 4 mM) junto a diferentes concentraciones de Rg1 (72,5, 125, 250 y 500 µg/ml) y/o BSA (100 µg/ml) (Figura 4). La placa se incubó en heladera y periódicamente se observó la formación de grumos o de un precipitado en el fondo de cada pocillo.

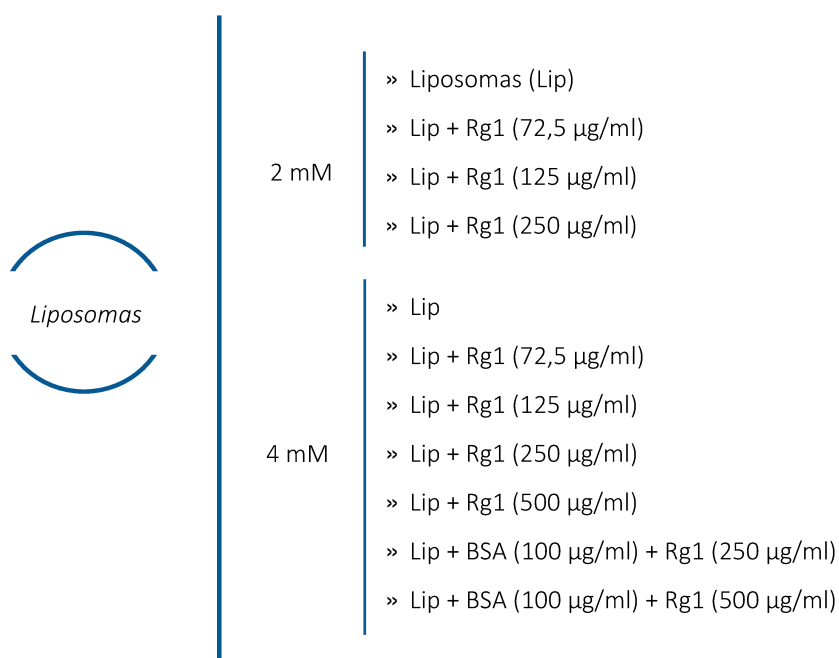


Figura 4. Evaluación de la estabilidad de los liposomas combinados con Rg1 y/o albúmina sérica bovina (BSA). Se testearon dos concentraciones de liposomas (2 y 4 mM) combinados con diferentes concentraciones de Rg1 (72,5, 125, 250 y 500 µg/ml) y/o BSA (100 µg/ml).

3.2.1.3. Animales.

Para llevar a cabo las inmunizaciones de los ensayos 1, 2 y 4 se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/cCmedc provenientes del Centro de Medicina Comparada (CMC, ICIVET-Litoral) de 4 a 8 semanas de edad. Los procedimientos con los animales experimentales se realizaron de acuerdo a las normas vigentes (NRC, 2011). Cabe destacar que tanto el protocolo inicial como

las modificaciones planteadas fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL (Resolución N° 320/16 y 374/17).

Para las inmunizaciones del ensayo 3 se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de 4 semanas de edad provenientes del laboratorio *Charles River*. El protocolo experimental fue evaluado y aprobado por el *Comité Institutionnel de Protection des Animaux* (CIPA) de la *Université du Québec à Montréal* (UQAM).

Es importante destacar que en los ensayos realizados en el CMC (ICIVET-Litoral) (ensayos 1, 2 y 4), los animales fueron alojados por grupo experimental en una misma jaula microventilada conectada a un sistema de ventilación. Todas las jaulas se encontraban en un mismo rack (estantería móvil ventilada) lo que proporciona un microambiente independiente y permite el alojamiento de múltiples especies/animales en la misma estantería móvil y en la misma habitación bajo condiciones controladas de temperatura, humedad e iluminación (POE GC-031-03).

3.2.2. Ensayo 1: ensayo preliminar para determinar la concentración de Rg1 a inocular en ratones.

3.2.2.1. Diseño experimental.

En una primera instancia, para definir la concentración de Rg1 a inocular en ratones, se probaron 3 concentraciones de Rg1 formulado con BSA como antígeno. Los grupos experimentales (5 animales/grupo) fueron los siguientes:

- ① BSA (100 µg/ml) + Rg1 (250 µg/ml) → *BSA + Rg1 (250 µg/ml)*
- ② BSA (100 µg/ml) + Rg1 (500 µg/ml) → *BSA + Rg1 (500 µg/ml)*
- ③ BSA (100 µg/ml) + Rg1 (750 µg/ml) → *BSA + Rg1 (750 µg/ml)*

Los animales de todos los grupos experimentales fueron inoculados 3 veces por vía subcutánea (100 µl finales por inoculación), en un solo punto de inoculación en la región inter escapular, en intervalos de 21 días. Previo a cada inoculación, se registró el peso de los animales y luego se tomó una muestra de sangre por punción submandibular a partir de la vena superficial temporal. Para la toma de muestra, se inmovilizó el animal por el pliegue nuchal y se desinfectó la zona de la mandíbula con alcohol. Posteriormente, se ubicó el sitio correcto de la vena superficial temporal que pasa por el interior de la mandíbula a unos 3-4 mm de profundidad y se procedió a realizar la punción con una aguja de 21G en una inclinación de 90°.

La gota de sangre fue inmediatamente recolectada con un tip (previamente tratado con EDTA) y colocada suavemente en un tubo evitando la hemólisis. Para detener el sangrado, se utilizó un algodón con una solución de agua oxigenada 10 v.

Finalmente, al día 50 (7 días de la tercera inoculación) los animales fueron anestesiados y, por punción cardíaca, sometidos a extracción completa de sangre anticoagulada. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 rpm a 4°C durante 10 min y el plasma obtenido fue alícuotado y conservado a -20°C para la realización de un inmunoensayo enzimático (ELISA).

3.2.2.2. Evaluación del estado de salud de los animales.

A los fines de evaluar el estado de salud a lo largo de todo el ensayo, los ratones fueron controlados después de cada maniobra realizada. Los mismos fueron observados diariamente para registrar posibles cambios en el comportamiento, pelaje y presencia de signos inflamatorios.

3.2.2.3. Determinación de IgG total anti-BSA mediante ELISA indirecto.

Los niveles de IgG total anti-BSA de cada muestra de plasma proveniente de animales inmunizados con las diferentes formulaciones previo a cada inoculación fueron determinados mediante ELISA indirecto.

Para ello, ciertos pocillos fueron sensibilizados con 1 µg de BSA e incubados a 37°C durante 90 min. Luego, fueron lavados con buffer tris salino (TBS) 1x + Tween-20 0,05% y bloqueados con TBS 1x + Leche 5% a 37°C durante 60 min. Las muestras de plasma (1/500) fueron incubadas a 37°C durante 60 min. Dicha dilución fue previamente seleccionada en ensayos previos donde se evaluaron diluciones seriadas de *pools* de muestras de cada grupo. Paralelamente, se hizo la misma dilución de un *pool* de plasma preinmune (*pool* preinmune, obtenido a partir de muestras de sangre previas a la primera inoculación) para determinar los niveles basales. La presencia de anticuerpos específicos fue detectada mediante la incubación con el anticuerpo *rabbit anti-mouse* IgG-peroxidasa (HRP) (1/10000, Sigma-Aldrich) seguida de la incubación con tetrametilbenzidina (TMB). La descripción del anticuerpo empleado se encuentra en el Anexo I. Finalmente, la reacción se frenó con H₂SO₄ (1 N) y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro (SPECTROstar^{Nano}). Los valores de absorbancia fueron medidos como DO.

3.2.3. Ensayo 2: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando BSA como antígeno.

3.2.3.1. Plan de inmunización.

Una vez definida la concentración de Rg1 a utilizar como resultado del ensayo 1, se propuso inmunizar ratones con BSA como antígeno combinado con diferentes formulaciones adyuvantes, como Rg1 y/o liposomas. Para este ensayo, los grupos experimentales (5 animales/grupo) fueron:

- ① BSA (100 µg/ml) → *BSA*
- ② BSA (100 µg/ml) + Liposomas (4 mM) → *BSA + Lip*
- ③ BSA (100 µg/ml) + Rg1 (500 µg/ml) → *BSA + Rg1*
- ④ BSA (100 µg/ml) + Liposomas (4 mM) + Rg1 (500 µg/ml) → *BSA + Lip + Rg1*

La inmunización de los animales consistió en 3 dosis en intervalos de 21 días. La administración de las diferentes formulaciones se realizó por vía subcutánea (100 µl/dosis), en un solo punto de inoculación en la zona interescapular. Las muestras de sangre fueron tomadas por punción submandibular previo a la primera inoculación (muestras preinmunes, día 1) y a los 50, 57 y 64 días (correspondientes a 7, 14 y 21 días luego de la tercera inoculación, respectivamente) con el fin de evaluar la producción de anticuerpos a lo largo del tiempo. Además, se registró el peso de los animales en cada inoculación y al momento del sacrificio. Tanto el pesaje de los animales como la toma de muestra al día 1, 50, 57 y 64, se realizaron previo a la inoculación. Finalmente, el día 64, los animales fueron anestesiados y, por punción cardíaca, sometidos a la extracción completa de sangre. Las muestras de sangre anticoagulada fueron centrifugadas a 1500 rpm y 4°C durante 10 min, y el plasma obtenido fue conservado a -20°C.

Las muestras de sangre tomadas el día del sacrificio (día 64), fueron analizadas por el autoanализador hematológico (Mindray 2800Vet) para evaluar los parámetros hematológicos de cada animal. Los animales de todos grupos experimentales fueron examinados periódicamente para evaluar el comportamiento luego de cada inoculación hasta el día del sacrificio.

3.2.3.2. Evaluación de la respuesta humoral inducida en ratones inmunizados con diferentes formulaciones adyuvantes mediante ELISA indirecto.

Los niveles de producción de IgG total anti-BSA se evaluaron en todos los grupos experimentales mediante ELISA indirecto, de manera similar a la detallada anteriormente en el

punto 3.1.2.3. En este caso, los pocillos fueron sensibilizados con 2 µg/pocillo de BSA, bloqueados e incubados con las muestras de plasma en una dilución 1/50. Tanto la concentración de antígeno utilizada para la sensibilización de la placa como la dilución óptima de las muestras fueron previamente seleccionadas luego de la puesta a punto de la técnica. La presencia de IgG específica fue detectada mediante la incubación con anti-*mouse* IgG-HRP (1/10000) seguida de la incubación con TMB. La descripción del anticuerpo empleado se encuentra en el Anexo I. Finalmente, la reacción se frenó con H₂SO₄ (1 N) y los valores de absorbancia (450 nm) fueron medidos como DO.

3.2.4. Ensayo 3: ensayo preliminar de inmunización en ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) y empleando un lisado de *S. aureus* como antígeno.

La evaluación preliminar de la capacidad adyuvante de Rg1 en un modelo *in vivo* de inmunización de ratones con un lisado de *S. aureus* se realizó en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de UQAM (Montréal, Canadá) bajo la supervisión de la Dra. Tatiana Scorza. Los ensayos se realizaron en el marco de una instancia de pasantía en la mencionada Universidad durante el cuarto año del Doctorado.

3.2.4.1. Plan de inmunización.

El ensayo se llevó a cabo realizando modificaciones relacionadas al volumen de inoculación y esquema de inmunización anteriormente ensayado a criterio de la responsable del Laboratorio, Dra. Scorza. Además, como control positivo de inoculación, se utilizó adyuvante incompleto de Freund (IFA, MP Biomedicals) en el grupo inmunizado con lisado, para garantizar la RI tanto humoral como celular. Los grupos experimentales (4 animales/grupo) se detallan a continuación:

- ① Lisado *S. aureus* (100 µg/ml) + IFA (1:1) → Lisado + IFA
- ② Lisado *S. aureus* (100 µg/ml) + Liposomas (4 mM) → Lisado + Lip
- ③ Lisado *S. aureus* (100 µg/ml) + Rg1 (500 µg/ml) → Lisado + Rg1
- ④ Lisado *S. aureus* (100 µg/ml) + Rg1 (500 µg/ml) + Liposomas (4 mM) → Lisado + Lip + Rg1
- ⑤ Control (sin inoculación)

La inmunización de los animales consistió en 3 dosis en intervalos de 14 días. La administración de las diferentes formulaciones se realizó por vía subcutánea (200 µl/dosis), en un solo sitio de inoculación en la zona inter escapular de los animales. Previo a cada inoculación, se registró el peso de los animales y luego se tomó una muestra de sangre de la vena safena para la evaluación de anticuerpos anti-*S. aureus* por ELISA (días 1, 15 y 29). Para la toma de muestra, los animales fueron inmovilizados en un tubo cónico de 50 ml, con la base cortada para facilitarles la respiración. Cuidadosamente, se sujetó una de las patas traseras del animal y se rasuró la zona. Luego de frotar delicadamente la zona con vaselina líquida, para evitar que la sangre se disemine, se punzó perpendicularmente la vena con una aguja 25G. La sangre fue recolectada en un tubo utilizando una pipeta y un tip heparinizado y finalmente fue centrifugada a 1800 rpm durante 10 min para obtener el plasma, el cual fue almacenado a -20°C hasta la realización del ELISA. Luego de cada toma de muestra e inoculaciones, los animales fueron monitoreados periódicamente.

A los 14 días de la tercera inoculación (día 43), los animales fueron sometidos a eutanasia mediante inhalación de isoflurano como anestesia, seguido de CO₂. Por punción intracardíaca se tomó la última muestra de sangre y se extrajo el bazo para posteriormente realizar ensayos de proliferación celular.

3.2.4.2. Evaluación de la respuesta humoral inducida en ratones inmunizados con las formulaciones adyuvantes y con un lisado de *S. aureus* mediante ELISA indirecto.

Para evaluar la respuesta humoral inducida en ratones inmunizados se determinaron los títulos de anticuerpos específicos anti-*S. aureus* (IgG total y el isotipo IgG2a) mediante ELISA indirecto.

Previo sensibilización *overnight* (ON) con 3 µg de lisado de *S. aureus*, los pocillos se lavaron y se bloquearon con PBS 1x + SFB 10% durante 2 hs. Luego, se incubaron con diluciones seriadas al medio de cada una de las muestras de plasma provenientes de los animales inmunizados. Para la determinación de IgG total las diluciones de las muestras fueron de 1/400 a 1/51200 mientras que para IgG2a, las diluciones fueron de 1/50 a 1/1600. Paralelamente, se realizaron las mismas diluciones de un *pool* de sueros pertenecientes al grupo *Control*. La presencia de anticuerpos específicos fue detectada mediante la incubación con los anticuerpos *goat anti-mouse* IgG-HRP (1/5000, Invitrogen) y *goat anti-mouse* IgG2a-HRP (1/2500, Invitrogen), seguida de la incubación con TMB. Los anticuerpos empleados se encuentran detallados en el Anexo I. Finalmente, la reacción se frenó con HCl (1 N) y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro.

A partir de la lectura de las absorbancias, se determinó el título de anticuerpos correspondiente a cada muestra. El valor de DO de corte para cada muestra fue aquel que superó dos veces el valor de DO del *pool* del grupo control. A partir de este valor, se calculó el título como la inversa de la última dilución del suero donde se observó el efecto.

3.2.4.3. Evaluación de la respuesta celular inducida en ratones inmunizados con las formulaciones adyuvantes y con un lisado de *S. aureus* mediante ensayos de linfoproliferación y caracterización de citoquinas.

3.2.4.3.1. Cultivo primario de células aisladas de bazo murino.

Inmediatamente luego del sacrificio de los animales, en condiciones de esterilidad, se realizó la extracción del bazo de los grupos experimentales evaluados. En una placa de Petri, cada bazo fue lavado con 3 ml de RPMI + SFB 10% + ATB/AM 1x y disgregado mecánicamente utilizando la parte posterior del émbolo de una jeringa. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1800 rpm durante 5 min y el *pellet* celular fue resuspendido en 2 ml de buffer de lisis para la lisis osmótica de los glóbulos rojos (Yuan *et al.*, 2010). Finalmente, previo lavado, se determinó la viabilidad celular con azul de tripán y las células de bazo fueron resuspendidas en RPMI + SFB 10% + ATB/AM 1x y cultivadas en placas de 96 y/o 24 pocillos, dependiendo del ensayo.

3.2.4.3.2. Evaluación de la respuesta linfoproliferativa mediante un kit de MTT.

Para evaluar la RI celular específica frente a *S. aureus* en ratones inmunizados con las diferentes formulaciones adyuvantes, se utilizó el kit de proliferación celular MTT (*MTT Cell Proliferation Assay Kit*, Abcam). El kit se basa en la conversión del compuesto MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) (soluble) en formazán (insoluble). Esta conversión es llevada a cabo por las enzimas mitocondriales en aquellas células metabólicamente activas. La cantidad de producto generado (precipitado) es proporcional a la cantidad de células vivas, lo cual puede cuantificarse a través de la medición de la absorbancia a 590 nm.

Las células de bazo (2×10^6 cél/ml) fueron sembradas en placas de 96 pocillos y luego estimuladas con medio (control sin estimular, basal) o con dos concentraciones diferentes de lisado de *S. aureus* (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$) como estímulos específicos. Paralelamente, otras células fueron estimuladas con anti-CD3 (2,5 $\mu\text{g/ml}$) como activador policlonal (control positivo de

proliferación). Este procedimiento se realizó con todos los animales de cada grupo, y todas las condiciones se hicieron por triplicado. Luego de 72 hs de incubación en estufa a 37°C y 5% CO₂, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se agregó el reactivo MTT en medio libre de suero. Luego de 3 hs de incubación, se adicionó el solvente y se leyó la absorbancia a 590 nm. Finalmente, el índice de proliferación (IP) se calculó de la siguiente manera:

$$IP = \frac{DO \text{ células estimuladas}}{DO \text{ células basales}}$$

3.2.4.3.3. Caracterización del perfil de citoquinas inducido mediante ELISA indirecto.

Con el objetivo de obtener una aproximación al perfil de RI celular inducido por *S. aureus*, se evaluó la producción de IFN γ e IL-4 en células de bazo provenientes de los animales inmunizados, como citoquinas características de los perfiles Th1 y Th2, respectivamente.

El ensayo se realizó de la misma manera que la detallada en el punto anterior (3.1.4.4.2) con la variante de la disposición de las células en placas de 24 pocillos (2x10⁶ cél/ml). Luego de las 72 hs de incubación con los diferentes estímulos, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se lo conservó a -80°C para la cuantificación de citoquinas por ELISA indirecto.

3.2.4.3.3.1. Cuantificación IFN γ .

Se evaluó la producción de IFN γ en los sobrenadantes de las células de bazo sin estimular (basales) y estimuladas con las diferentes concentraciones de lisado de *S. aureus* (5 y 10 μ g/ml) y anti-CD3, utilizando el kit de ELISA comercial *Mouse IFN γ ELISA MAXTM Deluxe Set* (Biolegend) y siguiendo la metodología propuesta por el fabricante.

En primera instancia, cierta cantidad de pocillos fueron sensibilizados con el anticuerpo de captura anti-IFN γ (1/200) ON a 4°C. Luego de varios lavados con PBS 1x + Tween-20 0,05% (pH 7,4), fueron bloqueados con diluyente A (1x) durante 1 h a TA y en agitación (200 rpm), con el fin de bloquear sitios inespecíficos y reducir el *background*. Los pocillos fueron nuevamente lavados e incubados con los sobrenadantes de cada condición, por duplicado, durante 2 hs a TA y 200 rpm. Paralelamente, para la cuantificación de IFN γ se realizó una curva de calibración a partir de un estándar de IFN γ de 105 ng/ml. Previo lavado, los pocillos fueron incubados con el anticuerpo de detección (1/200) por 1 h a TA y 200 rpm. Una vez realizados los lavados correspondientes, se les adicionó avidina-HRP (1/1000) y, finalmente, TMB. Pasados 20 min, se frenó la reacción con una solución de frenado o *stop*, y se leyó la absorbancia a 450 nm con corrección a 570 nm. La concentración de IFN γ se obtuvo por extrapolación de las DO obtenidas

en la curva de calibración realizada con el IFN γ recombinante provisto por el kit. Los resultados se expresaron como picogramo por mililitro (pg/ml).

3.2.4.3.3.2. Cuantificación IL-4.

La producción de IL-4 se evaluó en los sobrenadantes de las células de bazo sin estimular (basales) y estimuladas con las diferentes concentraciones de lisado (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$) y anti-CD3, utilizando el kit de ELISA *Mouse IL-4 ELISA MAXTM Deluxe Set* (Biolegend), siguiendo las indicaciones del fabricante.

La metodología empleada para la cuantificación de IL-4 fue la misma que para la cuantificación de IFN γ detallada en el punto 3.1.4.4.3.1. La concentración de IL-4 se obtuvo por extrapolación de las DO obtenidas en la curva de calibración realizada con IL-4 recombinante provista por el kit. Los resultados se expresaron como picogramo por mililitro (pg/ml).

3.2.5. Ensayo 4: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando un lisado de *S. aureus* como antígeno.

3.2.5.1. Plan de inmunización.

En función a todos los resultados preliminares obtenidos en los ensayos anteriores se realizó un último ensayo ampliando el número de animales por grupo y teniendo en cuenta algunas condiciones técnicas que se pusieron a punto previamente, como esquema de inoculación, volúmenes administrados y distintos puntos de inoculación en el lomo. En este caso, los grupos experimentales (8 animales/grupo) fueron:

- ① Lisado (100 $\mu\text{g/ml}$) → *Lisado*
- ② Lisado (100 $\mu\text{g/ml}$) + Liposomas (4 mM) → *Lisado + Lip*
- ③ Lisado (100 $\mu\text{g/ml}$) + Rg1 (500 $\mu\text{g/ml}$) → *Lisado + Rg1*
- ④ Lisado (100 $\mu\text{g/ml}$) + Liposomas (4 mM) + Rg1 (500 $\mu\text{g/ml}$) → *Lisado + Lip + Rg1*
- ⑤ Control (sin inocular) → *Control*

Los animales fueron inoculados 3 veces por vía subcutánea, en intervalos de 14 días. Las inoculaciones se realizaron en dos sitios distintos en el lomo de los animales (200 μl finales por inoculación). Antes de cada inoculación, se registró el peso y luego se tomó una muestra de

sangre de cada animal por punción submandibular (días 1, 15 y 29). Luego de las inoculaciones, los animales fueron controlados diariamente.

Dos semanas después de la última inoculación (día 43), los animales fueron anestesiados y, por punción cardíaca, sometidos a la extracción completa de sangre anticoagulada para la evaluación de la RI humoral por ELISA.

Previo al procesamiento de las muestras de sangre para la obtención de plasma, se hicieron los hemogramas de las muestras obtenidas el día del sacrificio utilizando un autoanalyzer hematológico con el fin de evaluar el estado de salud de los animales. Luego, las muestras fueron centrifugadas y el plasma obtenido fue conservado a -20°C. Por otro lado, luego del sacrificio, en condiciones de esterilidad, se realizó la extracción del bazo de cada uno de los animales para la evaluación de la RI celular mediante ensayos de linfoproliferación.

3.2.5.2. Evaluación de la RI humoral inducida en ratones inmunizados con las formulaciones adyuvantes y un lisado de *S. aureus*.

Se evaluó la RI humoral inducida en ratones inmunizados con las diferentes formulaciones mediante la determinación de los títulos de anticuerpos específicos IgG total anti-*S. aureus* y del isotipo IgG2a anti-*S. aureus* mediante ELISA indirecto, siguiendo la metodología detallada en el punto 3.1.4.3. En este caso, para determinar los niveles basales, se trabajó con un *pool* de sueros preinmunes (*pool* preinmune, obtenido a partir de muestras de sangre previo a la primera inoculación).

3.2.5.3. Evaluación de la RI celular inducida en ratones inmunizados con las formulaciones adyuvantes y un lisado de *S. aureus* mediante ensayos de linfoproliferación con CFSE.

Se evaluó la RI celular específica para *S. aureus* en células de bazo provenientes de los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones adyuvantes mediante ensayos de linfoproliferación y CF. El fundamento de esta técnica se basa en que el éster succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE, no fluorescente) ingresa a las células, es hidrolizado por esterasas intracelulares y generan la molécula fluorescente carboxyfluoresceína succinimidil ester (CFSE) que se une covalentemente a proteínas intracelulares, quedando retenida en el citosol. A medida que las células se dividen, el colorante se reparte proporcionalmente en las células hijas, permitiendo así estimar los ciclos de proliferación celular mediante la disminución de la intensidad del colorante (Green y Rowbottom, 2003).

Luego de obtener las células de bazo, siguiendo la metodología detallada en el punto 3.1.4.4.1, éstas fueron teñidas con CFSE (Molecular Probes, Lifes Technologies). Brevemente, 1×10^7 cél/bazo fueron lavadas con PBS 1x atemperado y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. El *pellet* celular fue resuspendido en 1 ml de PBS 1x y luego se le añadió 1 ml de una solución CFSE 2x, obteniéndose una concentración final de CFSE de 2,5 mM. Las células fueron incubadas durante 15 min a 37°C y al abrigo de la luz.

Luego de numerosos lavados con RPMI + SFB 10% frío para eliminar el exceso de colorante, se determinó la viabilidad de las células teñidas con azul de tripán. Las células de bazo teñidas (2×10^6 cél/ml) fueron sembradas en placas de 24 pocillos y luego incubadas con medio (basales) o estimuladas con el lisado de *S. aureus* (10 µg/ml) como estímulo específico. Paralelamente, otras células fueron estimuladas con Concanavalina A (Con A, 5 µg/ml) (Sigma-Aldrich) como activador policlonal (control positivo de proliferación). Las células estimuladas con Con A fueron incubadas por 72 hs mientras que las células estimuladas con el lisado de *S. aureus* fueron incubadas por 120 hs (Yuan *et al.*, 2010, 2016b). Pasados los tiempos de incubación, las células fueron despegadas suavemente de los pocillos, lavadas con buffer de citometría, resuspendidas en fluido de enfoque y, finalmente, adquiridas en el citómetro de flujo. Este procedimiento se realizó con todos los animales de cada grupo, y todas las condiciones se realizaron por triplicado.

La estrategia de selección de la población celular de interés empleada para el análisis de linfoproliferación se detalla a continuación. A partir de un gráfico *dot plot* de FSC-H vs. FSC-A se seleccionaron los singletes (células únicas) en R1 (Figuras 5 A y B). Dentro de R1, teniendo en cuenta los parámetros de FSC vs. SSC, se seleccionó la población de linfocitos (R2) (Figuras 5 C y D). Finalmente, en R2 se evaluaron las diferentes generaciones celulares producidas a partir de los basales de cada muestra mediante un histograma de cantidad de células vs. CFSE (Figuras 5 E y F).

El porcentaje de células con al menos un ciclo de división (porcentaje de células en proliferación) se calculó teniendo en cuenta la fluorescencia de las células basales de cada animal. A partir de ese valor de corte o *cut-off*, se determinó el % de células que proliferaron frente a cada estímulo (lisado de *S. aureus* o Con A). Finalmente, el porcentaje de proliferación se expresó como la media del % de células CFSE positivas en cada grupo.

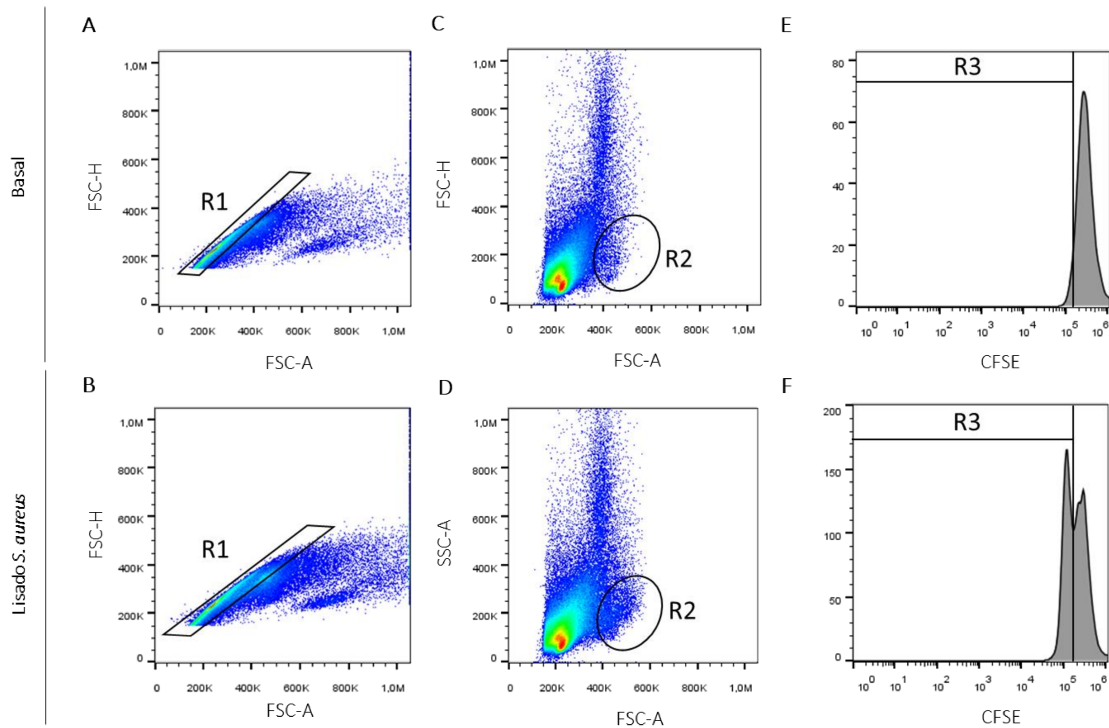


Figura 5. Gráficos representativos de la estrategia de selección de la población de interés para el análisis de linfoproliferación. A y B) Gráficos dot plot de la selección de singletes (R1). C y D) Gráficos dot plot de tamaño (FSC) vs. complejidad (SSC) para la selección de la población de linfocitos (R2). E y F) Histograma de la población de linfocitos CFSE positivos (R3) para el análisis de linfoproliferación.

3.2.6. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* fueron expresados como la media de los ensayos realizados \pm EEM. El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software *IBM SPSS Statistic 22*. La distribución y homogeneidad de los datos fueron analizadas con los *test* de Kolmogorov-Sminrov y Levene, respectivamente. La distribución de los datos, en la mayoría de los casos, no fue normal. Por lo tanto, las diferencias estadísticas se evaluaron con un *test* de modelos lineales generalizados (MLG). Todas las variables estudiadas mostraron una distribución gamma con enlace logaritmo y se consideró como factor la variable grupo. En el caso particular de los ensayos 1 y 2, los niveles de IgG se analizaron con un *test* de ecuaciones de estimación generalizadas (medidas repetidas), utilizando como variable sujeto, el número de animal y como variable intrasujeto, el tiempo de muestreo. En relación al ensayo 3, para la evaluación del IP y la concentración de IFN γ , se consideraron como factores, grupo y concentración de lisado empleada en el re-estímulo, con el fin de evaluar el efecto de ambos

factores y su interacción (grupo*concentración de lisado). A continuación, se analizó cada concentración de lisado por separado. Para el IP, con la concentración de 5 µg/ml, se realizó un test de MLG, utilizando como factor la variable grupo y para la concentración de 10 µg/ml se realizó un ANOVA multifactorial, debido a que la distribución de los datos fue normal. Para la cuantificación de IFN γ , en ambas concentraciones de lisado, se realizó un MLG, utilizando como factor la variable grupo. Particularmente para la evaluación del título de IgG, los resultados obtenidos fueron normales, por lo tanto el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA univariante seguido del *test* de Duncan como prueba de comparación múltiple. En todos los casos, las diferencias con valores de $p < 0,05$ se consideraron como significativas.

Es importante destacar que, en los ensayos 2 y 3 (particularmente para el análisis de IgG2a) no fue posible realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos debido a la baja cantidad de animales que respondieron en cada grupo experimental. Además, en la evaluación de la RI celular estudiada en los ensayos 3 y 4, los datos obtenidos de las células estimuladas con anti-CD3 o Con A (controles positivos de proliferación) no fueron considerados para el análisis estadístico de los resultados, pero si fueron graficados con el objetivo de demostrar el funcionamiento de los ensayos independientemente de los resultados obtenidos con Rg1 (Anexo II).



4. RESULTADOS

4.1. Evaluación del potencial inmunomodulatorio de Rg1 en células bovinas *in vitro*.

4.1.1. Efecto de Rg1 en la viabilidad de células bovinas.

En primera instancia se evaluó el posible efecto citotóxico de Rg1 en células bovinas mediante un ensayo de viabilidad celular empleando el *kit* XTT. En células MAC-T, no hubo diferencias en la viabilidad de células tratadas con las diferentes concentraciones de Rg1 (10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) y células controles (0 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1), en ninguno de los tiempos evaluados ($p_{2\text{ hs}} = 0,809$, $p_{8\text{ hs}} = 0,912$ y $p_{24\text{ hs}} = 0,868$) (Figura 6).

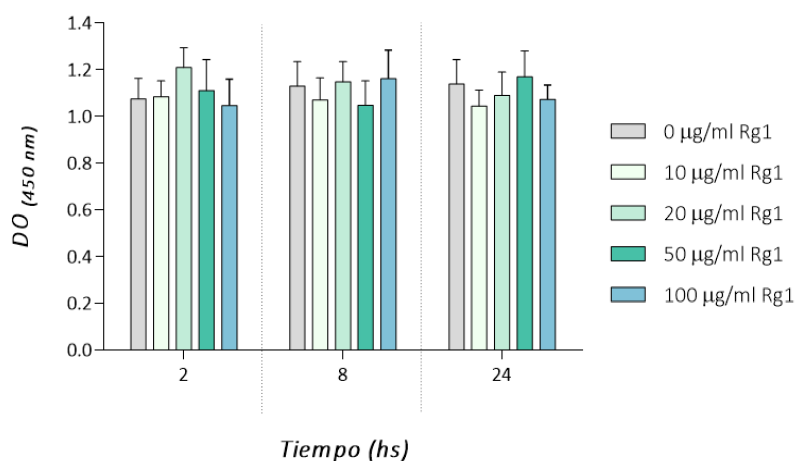


Figura 6. Viabilidad de células MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de Rg1 (0, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 2, 8 y 24 hs. Las barras representan la media de la densidad óptica (DO) \pm error estándar de la media (EEM) de 3 ensayos independientes.

En células aisladas de secreción mamaria y sangre, no hubo diferencias en la viabilidad de los diferentes cultivos tratados con Rg1 (250 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1) y células controles ($p = 0,419$ para MSMC y $p = 0,352$ para leucocitos) (Figura 7).

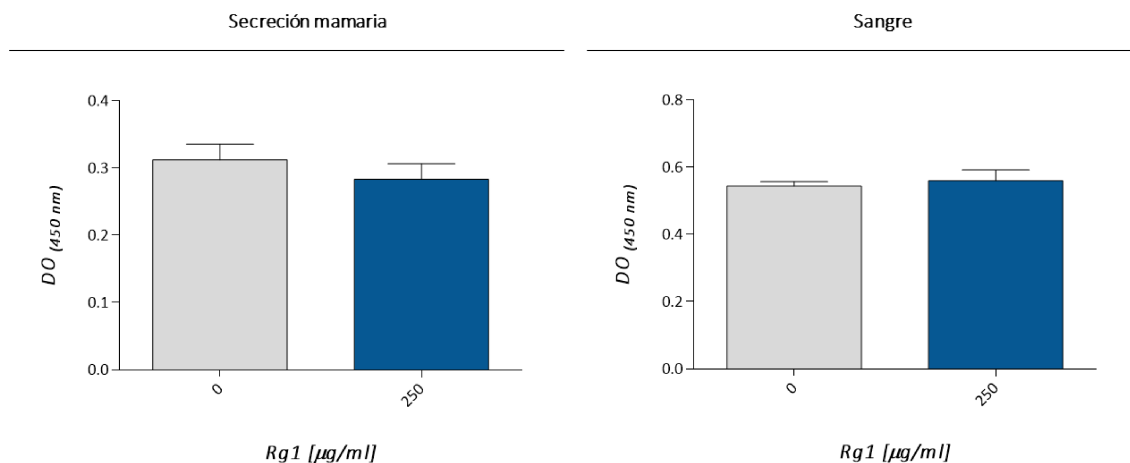


Figura 7. Viabilidad de células aisladas de secreción mamaria y sangre tratadas con 0 y 250 µg/ml de Rg1 durante 24 hs. Las barras representan la media de la densidad óptica (DO) \pm EEM de 3 ensayos independientes.

4.1.2. Efecto de Rg1 en la expresión génica de componentes de la inmunidad innata en células MAC-T.

Para evaluar el efecto de Rg1 en la expresión génica de los receptores tipo *toll*, TLR2 y TLR4, del factor de transcripción NFκB y de las citoquinas proinflamatorias TNFα e IL-6 en células MAC-T, se analizaron los niveles de ARNm de dichos genes mediante qPCR.

En relación a los TLRs, la expresión de ARNm de TLR2 no pudo cuantificarse debido a que la totalidad de las muestras evaluadas dieron por debajo del rango dinámico de la curva estándar. Para TLR4, no hubo diferencias estadísticas en los niveles de expresión de ARNm entre las concentraciones de Rg1 evaluadas y el grupo control, en ninguno de los tiempos de estudio ($p_{2 \text{ hs}} = 0,970$, $p_{6 \text{ hs}} = 0,934$ y $p_{24 \text{ hs}} = 0,895$) (Figura 8 A).

En relación al factor de transcripción, si bien los niveles de expresión de ARNm de NFκB en células MAC-T en todas las concentraciones de Rg1 fueron menores respecto a células del grupo control, no hubo diferencias estadísticas entre los grupos en ninguno de los tiempos evaluados ($p_{2 \text{ hs}} = 0,458$, $p_{6 \text{ hs}} = 0,295$ y $p_{24 \text{ hs}} = 0,773$) (Figura 8 B). En cuanto a las citoquinas proinflamatorias estudiadas, para TNFα, únicamente pudo cuantificarse su expresión a las 24 hs. Si bien hubo un aumento en la expresión de ARNm de esta citoquina en células MAC-T tratadas con 50 y 100 µg/ml de Rg1, este aumento no fue significativo comparado con los diferentes grupos evaluados ($p_{2 \text{ hs}} = 0,685$, $p_{6 \text{ hs}} = 0,688$ y $p_{24 \text{ hs}} = 0,602$) (Figura 8 C). Para el caso de IL-6, si bien hubo un aumento en los niveles de expresión de ARNm de esta citoquina en células MAC-T

tratadas con 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1 a las 6 hs, este aumento no fue significativo comparado con los diferentes grupos evaluados ($p_{2\text{hs}} = 0,567$, $p_{6\text{hs}} = 0,579$ y $p_{24\text{hs}} = 0,983$) (Figura 8 D).

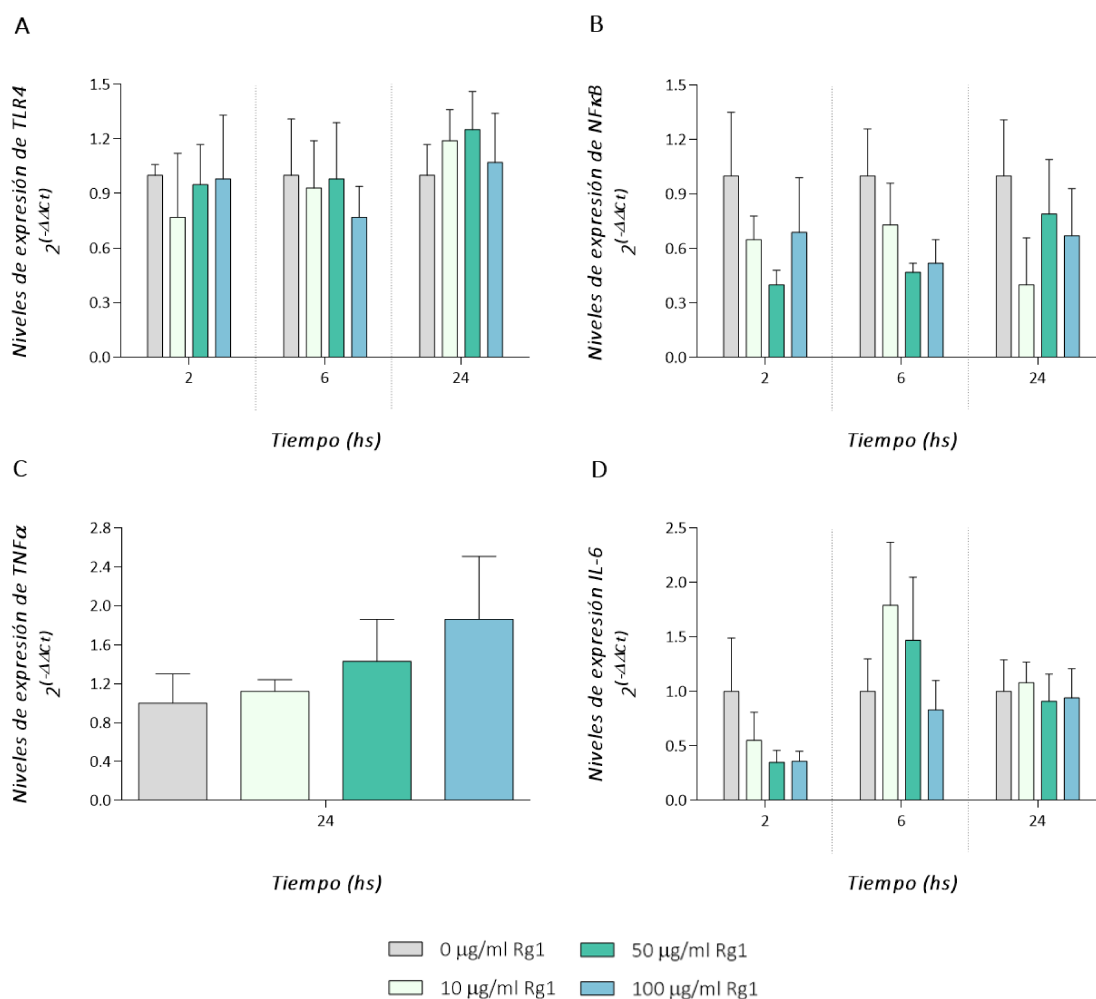


Figura 8. Efecto de Rg1 en la expresión génica en células MAC-T. Niveles de expresión relativa de ARNm de TLR4 (A), NFκB (B), TNFα (C) e IL-6 (D) en MAC-T tratadas con 0, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1 durante 2, 6 y 24 hs. Las barras representan la media del $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ EEM de 3 ensayos independientes.

4.1.3. Efecto de Rg1 en la expresión génica de componentes de la inmunidad innata en MSMC.

Para evaluar el efecto de Rg1 en la expresión génica de TLR2, TLR4, TNFα, IL-1β, IL-6 e IL-8 en MSMC, se analizaron los niveles de ARNm de dichos genes mediante qPCR. En relación a los TLRs, hubo un aumento en los niveles de expresión de ARNm de ambos receptores en las

MSMC tratadas con 250 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1 a las 8 hs, encontrándose una tendencia estadística para TLR2 ($p_{2\text{ hs}} = 0,465$, $p_{8\text{ hs}} = 0,078$ y $p_{24\text{ hs}} = 0,366$) y una diferencia significativa para TLR4 ($p_{2\text{ hs}} = 0,364$, $p_{8\text{ hs}} = 0,009$ y $p_{24\text{ hs}} = 0,602$) (Figura 9 A y B).

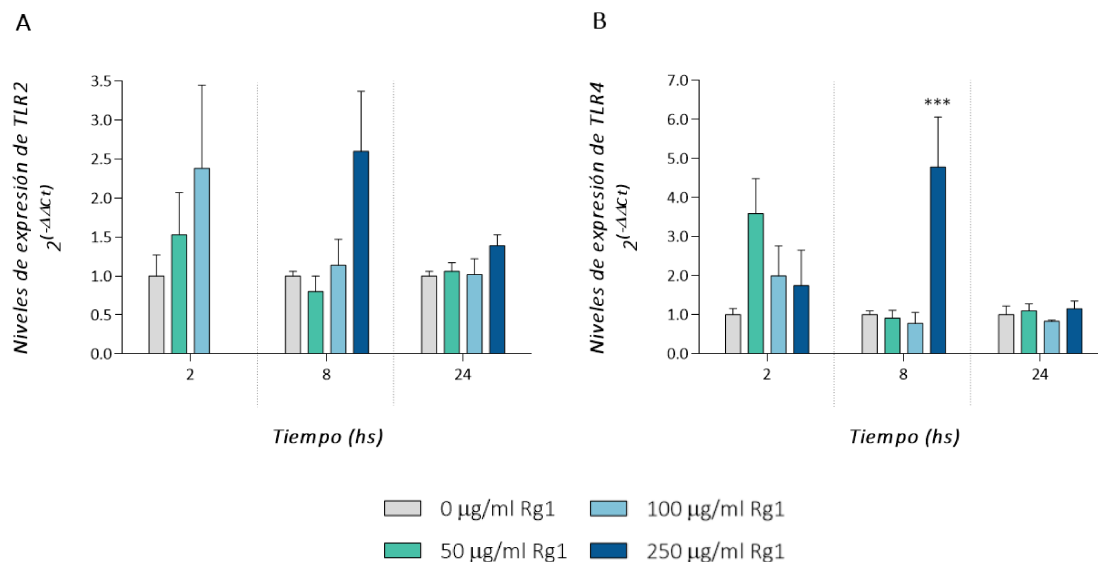


Figura 9. Efecto de Rg1 en la expresión génica de TLRs en células mononucleares de secreción mamaria (MSMC). A) Niveles de expresión relativa de ARNm de TLR2 (A) y TLR4 (B) en MSMC tratadas con 0, 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1 durante 2, 8 y 24 hs. Las barras representan la media del $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ EEM de 3 ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas (***) $p < 0,001$.

En relación a las citoquinas proinflamatorias, no hubo diferencias en los niveles de expresión de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ entre los grupos en estudio, en ninguno de los tiempos evaluados ($p_{2\text{ hs}} = 0,769$, $p_{8\text{ hs}} = 0,136$ y $p_{24\text{ hs}} = 0,136$ para $\text{TNF}\alpha$ y $p_{2\text{ hs}} = 0,133$, $p_{8\text{ hs}} = 0,725$ y $p_{24\text{ hs}} = 0,342$ para $\text{IL-1}\beta$) (Figura 10 A y B). Cuando se evaluaron los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6 e IL-8 en MSMC tratadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1, sólo se observó un aumento significativo a las 24 hs ($p_{2\text{ hs}} = 0,224$, $p_{8\text{ hs}} = 0,114$ y $p_{24\text{ hs}} = 0,011$ para IL-6 y $p_{2\text{ hs}} = 0,502$, $p_{8\text{ hs}} = 0,996$ y $p_{24\text{ hs}} = 0,020$ para IL-8) (Figura 10 C y D).

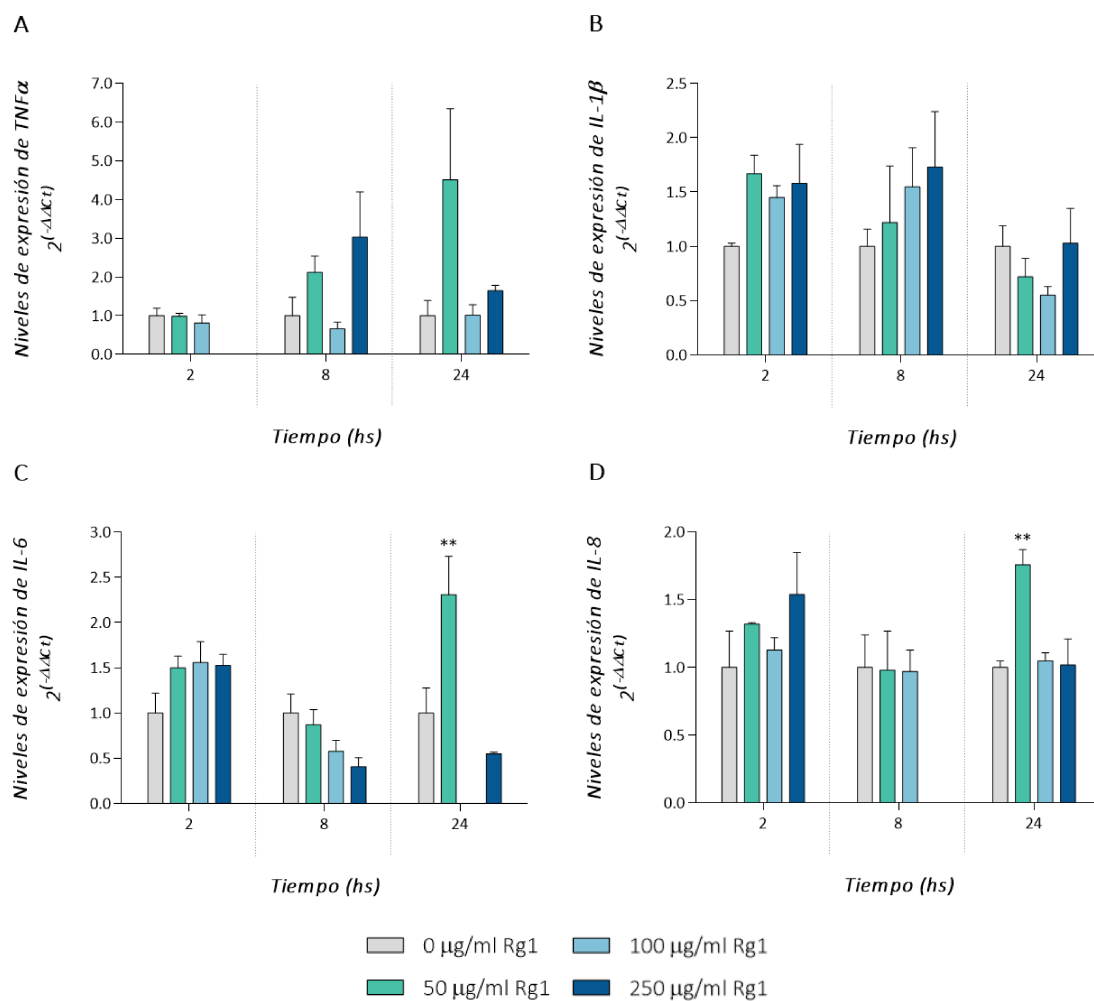


Figura 10. Efecto de Rg1 en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias en células mononucleares de secreción mamaria (MSMC). A) Niveles de expresión relativa de ARNm de TNFα (A), IL-1β (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) en MSMC tratadas con 0, 50, 100 y 250 µg/ml de Rg1 durante 2, 8 y 24 hs. Las barras representan la media del $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ EEM de 3 ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas (**, $0,01 < p < 0,05$).

4.1.4. Efecto de Rg1 en la expresión proteica de TLR2 y TLR4 en MSMC y PBMC.

El efecto de Rg1 en la expresión proteica de TLR2 y TLR4 se evaluó mediante CF. El porcentaje de TLR2 y TLR4 fue significativamente mayor en MSMC y PBMC tratadas con Rg1 (250 µg/ml) respecto a células basales ($p_{TLR2} = 0,026$ y $p_{TLR4} < 0,001$, para MSMC y $p_{TLR2} = 0,048$ y $p_{TLR4} < 0,001$ para PBMC). En relación a los controles positivos utilizados, el porcentaje de expresión de TLR2 y TLR4 en células estimuladas con LTA y LPS respectivamente, fue similar o mayor respecto a células basales, tanto en secreción mamaria como en sangre (Figura 11).

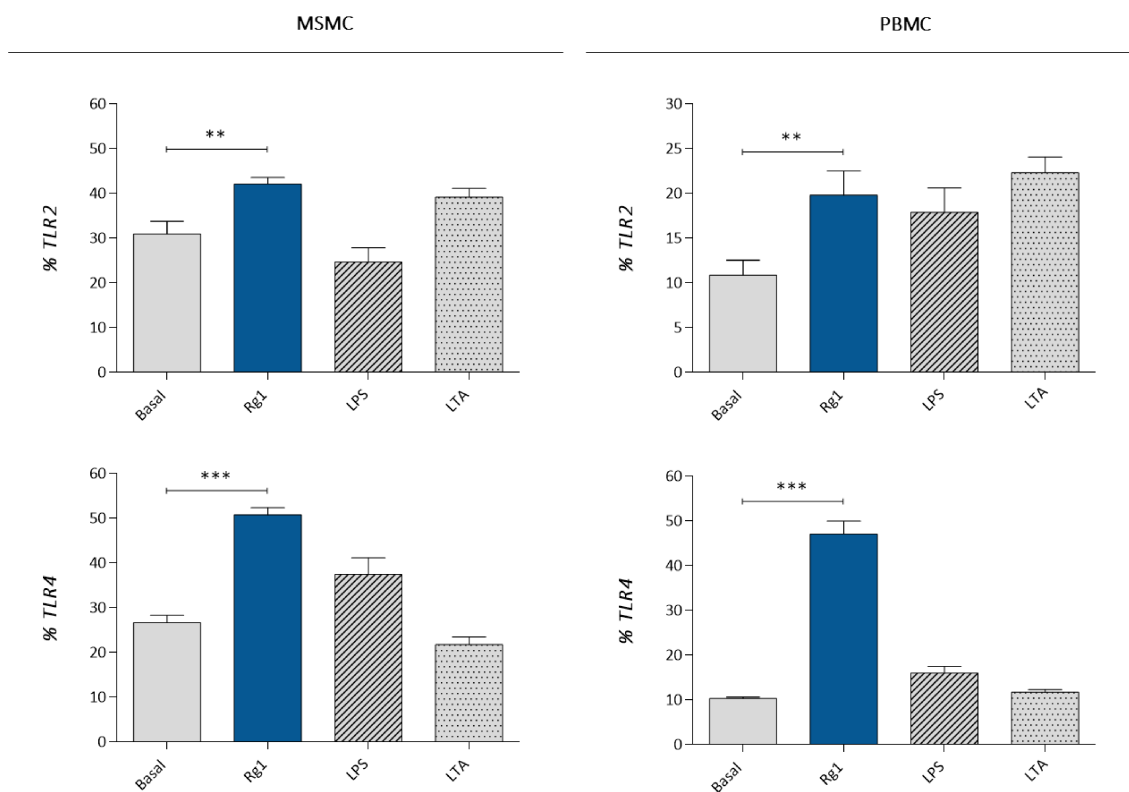


Figura 11. Porcentaje de expresión proteica de TLR2 y TLR4 en células mononucleares de secreción y de sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente) tratadas con Rg1 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$), lipopolisacárido (LPS, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ácido lipoteicoico (LTA, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24 hs. Cada barra representa la media del porcentaje de expresión de TLR2 o TLR4 \pm EEM de 4 ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas (** 0,01 < p < 0,05 y *** p < 0,001).

4.1.5. Efecto de Rg1 en la producción intracelular de ROS luego del co-cultivo de MSMC y PBMC con *S. aureus*.

El efecto de Rg1 en la producción intracelular de ROS, luego del co-cultivo de células mononucleares con la cepa 5011 de *S. aureus*, fue evaluado por CF. Tanto en secreción mamaria como en sangre, las células con bacterias adheridas y/o internalizadas (MSMC y PBMC FITC⁺) tratadas con Rg1, produjeron un mayor porcentaje de ROS en comparación con las células basales (p = 0,004 y p < 0,001, respectivamente). Respecto al control positivo, el porcentaje de ROS en células FITC⁺ estimuladas con PMA fue mayor respecto a las células basales y con valores similares a las células tratadas con Rg1 para ambos tipos celulares evaluados (Figura 12).

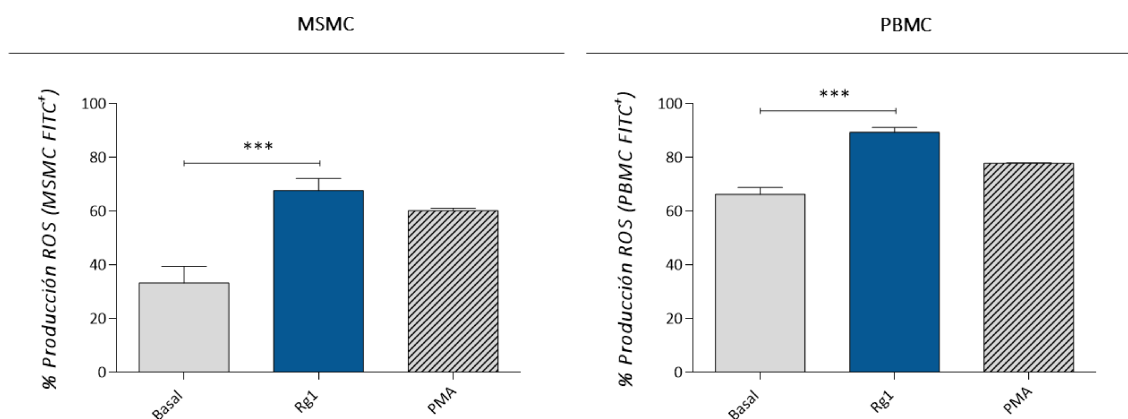


Figura 12. Porcentaje de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células mononucleares de secreción y de sangre periférica (MSMC y PBMC, respectivamente) FITC⁺ tratadas con Rg1 (250 µg/ml) y forbol-12-mistirato-13-acetato (PMA, 50 ng/ml) durante 24 hs. Cada barra representa la media del porcentaje de ROS producido ± EEM de 4 ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas (***) p < 0,001).

4.1.6. Efecto de Rg1 en la expresión de CMH-II y CD80 en MSCM y PBMC.

En primera instancia, se evaluó el porcentaje de células CD14⁺ (macrófagos y monocitos) luego del tratamiento de células de secreción mamaria y sangre con Rg1. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias en el porcentaje de células CD14⁺ luego del tratamiento con respecto a células basales, tanto en secreción como en sangre (p = 0,509 y p = 0,403, respectivamente) (Figura 13).

Luego, para evaluar el potencial efecto de Rg1 en la activación de macrófagos y monocitos bovinos, se analizó la expresión de CMH-II y CD80 en células CD14⁺. En secreción mamaria, no hubo diferencias en el porcentaje de expresión de ambos marcadores de activación en macrófagos tratados con Rg1 respecto a los basales (p = 0,506). Sin embargo, en sangre, el porcentaje de expresión de CMH-II y CD80 fue mayor en monocitos tratados con Rg1 respecto a monocitos basales (p < 0,001). Por otro lado, respecto a los controles positivos, el porcentaje de expresión de CMH-II y CD80 tanto en macrófagos como monocitos estimulados con LPS y LTA fue mayor a las células basales y con valores similares a los porcentajes obtenidos en células tratadas con el Rg1 (Figura 13).

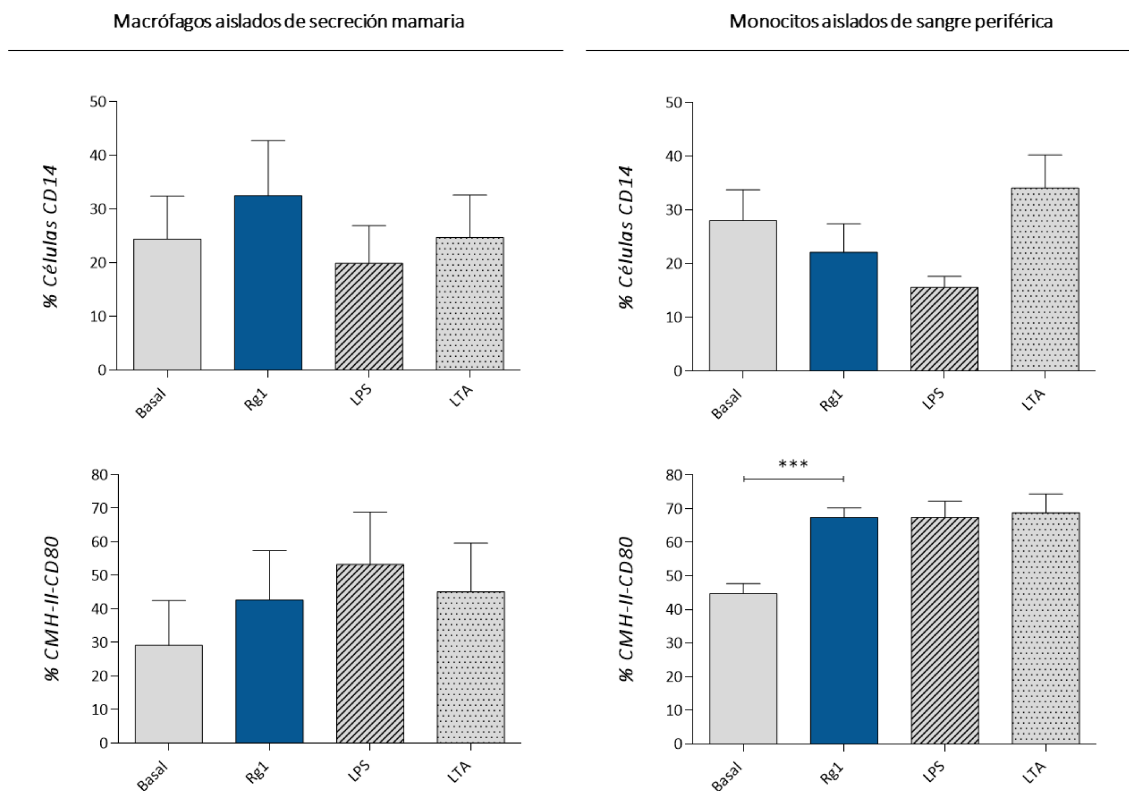


Figura 13. Porcentaje de macrófagos y monocitos (células CD14⁺) y porcentaje de expresión de CMH-II y CD80 en macrófagos y monocitos tratados con Rg1 (250 µg/ml), lipopolisacárido (LPS, 2,5 µg/ml) y ácido lipoteicoico (LTA, 2,5 µg/ml) durante 24 hs. Cada barra representa la media del porcentaje de células CD14 o de expresión de CMH-II-CD80 ± EEM de 4 ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas (***) p < 0,001).

4.2. Evaluación de la capacidad adyuvante de Rg1 en un modelo murino *in vivo*.

4.2.1. Ensayo 1: ensayo preliminar para determinar la concentración de Rg1 a inocular en ratones.

4.2.1.1. Evaluación del estado de salud de los animales.

La recuperación de los animales luego de cada inoculación, en cuanto al estado físico y al comportamiento, fue muy buena. Si bien luego de cada inoculación, los animales presentaban una reacción inflamatoria leve en el sitio de depósito del inóculo, la misma disminuía hasta desaparecer completamente a las 2 hs post inoculación. Además, el peso de los animales de

todos los grupos aumentó progresivamente a lo largo del ensayo (Anexo II) y no se registraron muertes post inoculación.

4.2.1.2. Determinación de IgG total anti-BSA.

Los niveles de anticuerpos específicos anti-BSA en plasma de ratones inmunizados con las diferentes formulaciones adyuvantes se evaluaron mediante ELISA indirecto. El grupo *BSA + Rg1 (500 µg/ml)* mostró mayores valores de DO respecto a los grupos *BSA + Rg1 (250 µg/ml)* y *BSA + Rg1 (750 µg/ml)* en todos los tiempos evaluados (días 22, 43 y 50); sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Figura 14). De la observación de la figura 14 se puede inferir una alta variabilidad en las DO obtenidas para cada concentración de Rg1 estudiada. Sin embargo, considerando que el grupo de animales inoculados con *BSA + Rg1 (500 µg/ml)* fue el que mostró mayor producción de anticuerpos en todos los tiempos analizados, se decidió utilizar la mencionada concentración de Rg1 en combinación con 100 µg/ml de BSA para los siguientes ensayos.

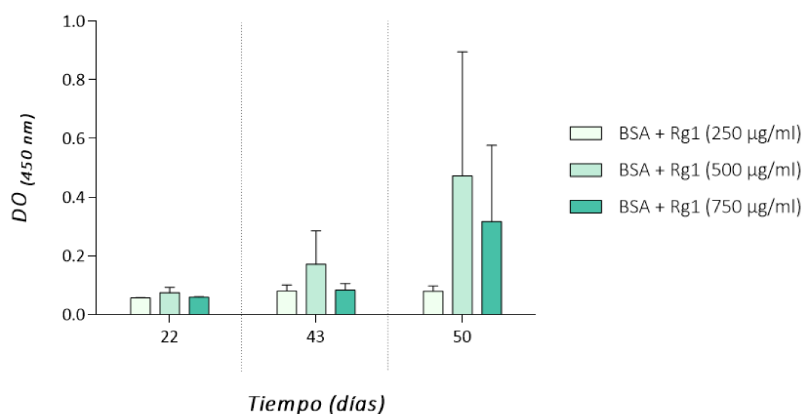


Figura 14. Niveles de IgG total anti-albúmina sérica bovina (anti-BSA) evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales a los distintos tiempos de toma de muestra. Los resultados se expresan como la media de la densidad óptica (DO) \pm errores estándar de la media (EEM) (n = 5).

4.2.2. Ensayo 2: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando BSA como antígeno.

4.2.2.1. Evaluación de la estabilidad de los liposomas.

En los ensayos de estabilidad de los liposomas formulados no se observó la presencia de grumos ni precipitado en los pocillos en todas las formulaciones testeadas. Esto demostró que los liposomas generados, fueron estables en el tiempo, lo que permitió continuar con los ensayos planteados.

4.2.2.2. Evaluación del estado de salud de los animales.

Si bien la recuperación de los animales luego de cada inoculación fue rápida y muy buena, dos animales del grupo *Rg1 + Lip* tuvieron que ser sacrificados antes de finalizar el protocolo debido a que, luego de la tercera inoculación, se mostraron estresados y alterados en su comportamiento, realizando movimientos anormales a la especie dentro de la jaula.

Por otro lado, tanto el peso de los animales como los parámetros hematológicos evaluados fueron los esperados para la especie (Anexo II).

4.2.2.3. Evaluación de la RI humoral inducida en ratones inmunizados con diferentes formulaciones adyuvantes.

Los niveles de anticuerpos específicos anti-BSA en plasma de ratones inmunizados con las diferentes formulaciones se evaluaron mediante ELISA indirecto. En este ensayo, solo los grupos *BSA* y *BSA + Rg1* respondieron a los tratamientos aplicados. Además, dentro de estos dos grupos, se observó una elevada heterogeneidad en la respuesta de cada animal, observándose una gran dispersión en los niveles de IgG total para cada tratamiento a lo largo del tiempo. A modo descriptivo, los resultados mostraron que los niveles de IgG obtenidos en animales inmunizados con *BSA* alcanzaron un valor máximo al día 50, disminuyendo progresivamente los días 57 y 64. Por su parte, los animales inmunizados con *BSA + Rg1* alcanzaron el máximo valor al día 57, manteniéndose constantes hasta el día 64. Por otro lado, los niveles de IgG obtenidos en animales inmunizados tanto con *BSA + Lip* como con *BSA + Rg1 + Lip* fueron bajos y constantes en todos los tiempos (Figura 15).

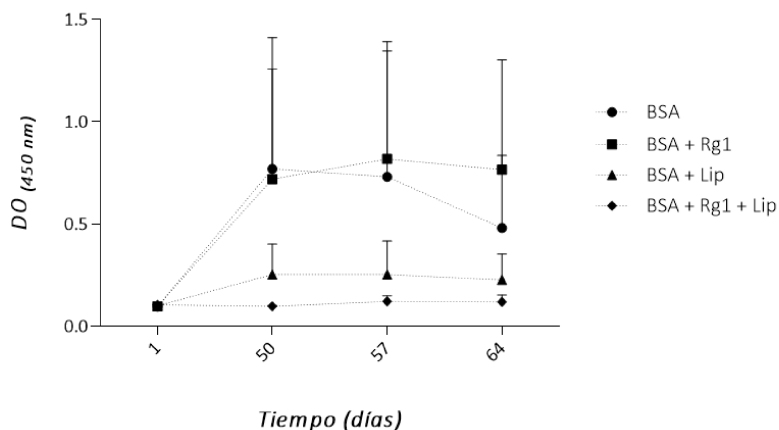


Figura 15. Niveles de IgG total anti-albúmina sérica bovina (anti-BSA) evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. Se grafican las medias de las densidades ópticas (DO) de los grupos BSA, BSA + Rg1, BSA + Lip y BSA + Rg1 + Lip, en función a los diferentes tiempos de muestreo (días 1, 50, 57 y 64) \pm EEM (n = 5).

4.2.3. Ensayo 3: ensayo preliminar de inmunización en ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) y empleando un lisado de *S. aureus* como antígeno.

4.2.3.1. Evaluación del estado de salud de los animales.

La recuperación de los animales luego de cada inoculación fue rápida y buena. No se registraron muertes a lo largo del ensayo. El peso de los animales aumentó progresivamente a lo largo del ensayo y los promedios estuvieron dentro de los valores esperados para la especie (Anexo II).

4.2.3.2. Evaluación de la RI humoral inducida en ratones inmunizados con un lisado de *S. aureus*.

Los niveles de anticuerpos específicos anti-*S. aureus* en plasma de ratones inmunizados con las diferentes formulaciones se evaluaron mediante ELISA indirecto.

4.2.3.2.1. Determinación del título de IgG total anti-*S. aureus*.

El título de IgG total anti-*S. aureus* fue mayor en el grupo *Lisado + IFA* respecto a los grupos *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1* ($p < 0,05$) y similar al título detectado en el grupo *Lisado + Lip + Rg1*.

En relación al título de IgG obtenido en el grupo *Lisado + Lip + Rg1*, si bien fue mayor respecto a los grupos *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1*, estas diferencias no fueron significativas (Figura 16).

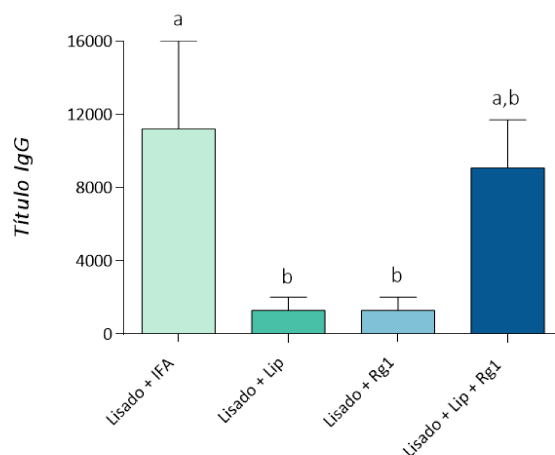


Figura 16. Títulos de IgG total anti-*S. aureus* evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media del título de IgG ± EEM (n = 4). Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

4.2.3.2.2. Determinación del título de IgG2a anti *S. aureus*.

No fue posible realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos debido a que en los grupos *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1*, solo dos animales modificaron los niveles de IgG2a luego del tratamiento. A modo descriptivo, el grupo *Lisado + Lip + Rg1* presentó mayor título de IgG2a anti *S. aureus* respecto a los grupos *Lisado + IFA*, *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1*. Es importante destacar que, en este caso, el título obtenido por el grupo *Lisado + Rg1* fue mayor al obtenido por el grupo *Lisado + Lip* (Figura 17).

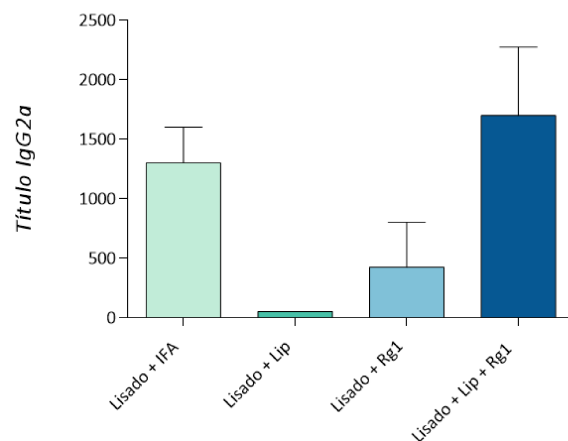


Figura 17. Títulos de IgG2a anti-*S. aureus* evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media del título de IgG2a \pm EEM (n = 4).

4.2.3.3. Evaluación de la RI celular inducida mediante ensayos de linfoproliferación y caracterización de citoquinas.

4.2.3.3.1. Ensayos de linfoproliferación.

La proliferación de células de bazo de los diferentes grupos experimentales, re-estimuladas con 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de lisado de *S. aureus* se evaluó mediante MTT. Si bien los IP estuvieron influenciados por el efecto grupo ($p_{\text{Grupo}} < 0,001$), no fueron afectados por la concentración de lisado utilizada en la re-estimulación de las células ($p_{\text{Conc. lisado}} = 0,316$) ni tampoco por la interacción entre ambos factores ($p_{\text{Grupo*Conc. lisado}} = 0,747$).

Teniendo en cuenta que no hubo diferencias en el IP de células estimuladas con las diferentes concentraciones de lisado, se analizó el efecto de cada concentración individualmente. En relación a las células re-estimuladas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de lisado de *S. aureus*, los grupos *Lisado + IFA* y *Lisado + Lip* mostraron mayores IP respecto a los grupos *Lisado + Rg1*, *Lisado + Lip + Rg1* y *Control* ($p < 0,05$) (Figura 18). Resultados similares se obtuvieron en las células estimuladas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de lisado de *S. aureus*. Los grupos *Lisado + IFA* y *Lisado + Lip* mostraron mayores IP respecto a los grupos *Lisado + Rg1*, *Lisado + Lip + Rg1* y *Control* ($p < 0,05$) (Figura 18).

Finalmente, en relación al control positivo utilizado, el IP de las células de bazo estimuladas con anti-CD3 fue mayor en todos los grupos experimentales respecto a las células basales de cada grupo (Anexo II).

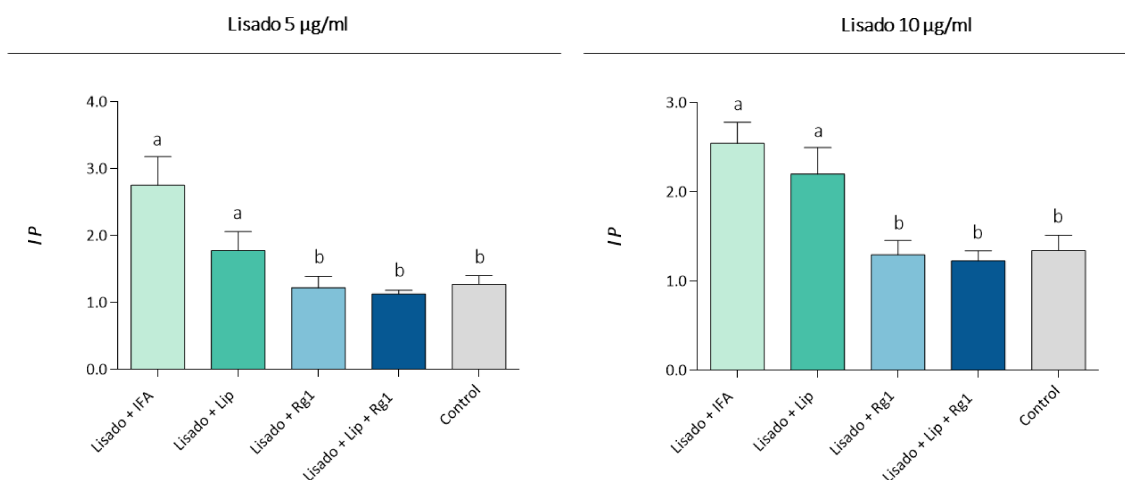


Figura 18. Índice de proliferación (IP) en células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con 5 µg/ml y 10 µg/ml de lisado de *S. aureus*. Los resultados fueron expresados como la media del IP de los diferentes grupos experimentales re-estimulados con lisado *S. aureus* ± EEM (n = 4). Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

4.2.3.3.2. Caracterización del perfil de citoquinas.

La producción de citoquinas (IFN γ e IL-4) por las células de bazo de los diferentes grupos experimentales re-estimuladas con 5 y 10 µg/ml de lisado de *S. aureus* fue evaluada mediante ELISA indirecto.

4.2.3.3.2.1. Cuantificación de IFN γ .

Si bien la producción de IFN γ estuvo influenciada por el efecto grupo ($p_{\text{Grupo}} < 0,001$), no estuvo afectada por la concentración de lisado ($p_{\text{Conc. lisado}} = 0,118$) ni por la interacción entre ambos factores ($p_{\text{Grupo*Conc. lisado}} = 0,398$).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que no hubo diferencias en la producción de IFN γ en células estimuladas con las diferentes concentraciones de lisado, se analizó el efecto de cada concentración individualmente. En relación a las células re-estimuladas con 5 µg/ml de lisado de *S. aureus*, si bien la producción de IFN γ fue mayor en los grupos *Lisado + IFA*, *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1* respecto a los grupos *Lisado + Lip + Rg1* y *Control*, no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos (Figura 19). En relación a las células re-estimuladas con 10 µg/ml de lisado de *S. aureus*, la concentración de IFN γ producida por los grupos *Lisado + IFA* y *Lisado + Lip* fue significativamente mayor a la concentración producida por los grupos *Lisado + Rg1*, *Lisado + Lip + Rg1* y *Control*. A su vez, la concentración de IFN γ producida por el grupo *Control* fue significativamente menor al resto de los grupos evaluados (p < 0,05) (Figura 19).

En relación al control positivo, la producción de IFN γ por las células de bazo estimuladas con anti-CD3 fue mayor en todos los grupos experimentales respecto a las células basales de cada grupo (Anexo II).

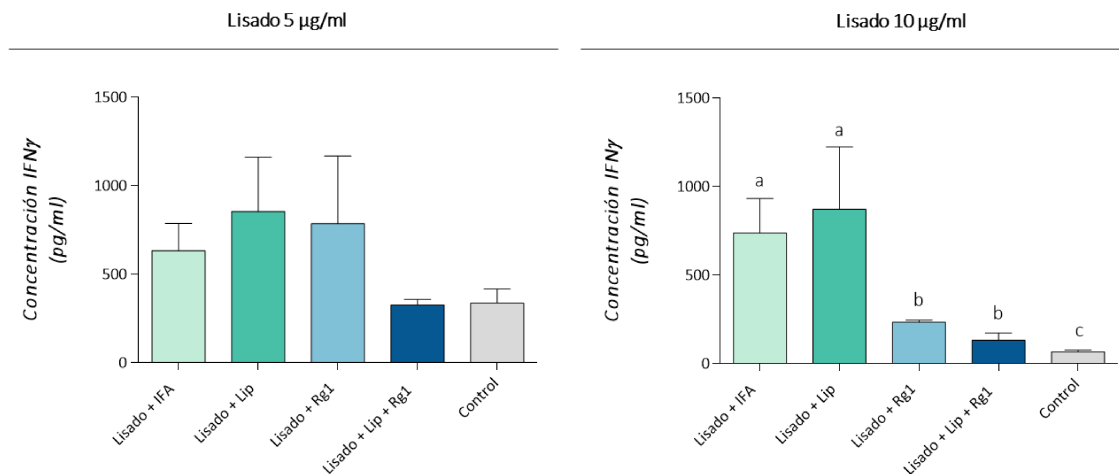


Figura 19. Producción de IFN γ en sobrenadantes de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con 5 μ g/ml y 10 μ g/ml de lisado de *S. aureus*. Los resultados fueron expresados como la media de la concentración de IFN γ de los diferentes grupos experimentales \pm EEM (n = 4). Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

4.2.3.3.2.2. Cuantificación de IL-4.

La producción de IL-4 por las células estimuladas con 5 y 10 μ g/ml de lisado de *S. aureus* no pudo ser cuantificada debido a que los valores obtenidos fueron menores al límite de detección de la prueba (1 pg/ml).

En relación al control positivo, la producción de IL-4 por las células de bazo estimuladas con anti-CD3 fue mayor respecto a las células basales de cada grupo (Anexo II).

4.2.4. Ensayo 4: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando un lisado de *S. aureus* como antígeno.

4.2.4.1. Evaluación del estado de salud de los animales.

La recuperación de los animales luego de cada inoculación fue rápida y buena. No se registraron muertes a lo largo del ensayo. Por otro lado, tanto el peso de los animales como los parámetros hematológicos evaluados fueron los esperados para la especie (Anexo II).

4.2.4.2. Evaluación de la RI humoral inducida en ratones inmunizados con un lisado de *S. aureus*.

De igual manera que en el ensayo 3, los niveles de anticuerpos específicos anti-*S. aureus* en plasma de ratones inmunizados con las diferentes formulaciones se evaluaron mediante ELISA indirecto.

4.2.4.2.1. Determinación del título de IgG total anti *S. aureus*.

Todos los grupos tratados mostraron títulos de IgG total anti-*S. aureus* superiores a los títulos encontrados en el grupo *Control* ($p < 0,05$). Los títulos de IgG total fueron similares en los grupos *Lisado + Lip*, *Lisado + Rg1* y *Lisado + Lip + Rg1* y mayores al título obtenido en el grupo *Lisado* ($p < 0,05$) (Figura 20).

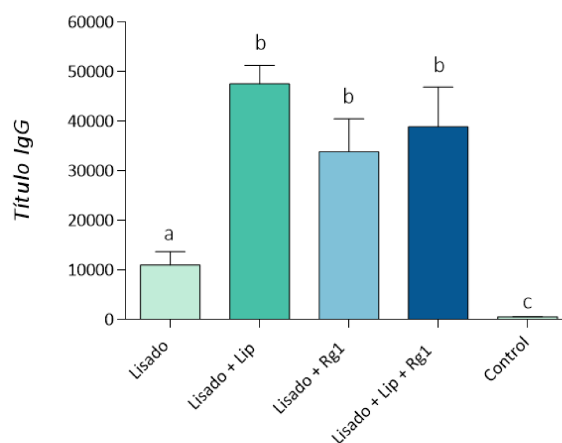


Figura 20. Títulos de IgG total evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media del título de IgG \pm EEM ($n = 8$). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.4.2.2. Determinación del título de IgG2a anti-*S. aureus*.

Si bien los títulos de IgG2a obtenidos para los grupos *Lisado + Lip*, *Lisado + Rg1* y *Lisado + Lip + Rg1* fueron mayores respecto al grupo *Lisado*, sólo los títulos de IgG2a en los grupos *Lisado* y *Lisado + Lip* fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) (Figura 21). En relación al grupo *Control*, no fue posible la determinación del título ya que todas las muestras tuvieron DO menores a la del suero preinmune.

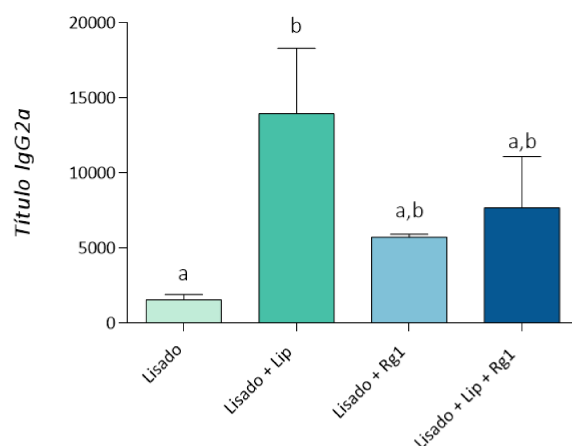


Figura 21. Títulos de IgG2a anti-*S. aureus* evaluados en plasma de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresaron como la media del título de IgG2a \pm EEM ($n = 8$). Letras distintas denotan diferencias significativas entre grupos experimentales.

4.2.4.3. Evaluación de la RI celular inducida en ratones inmunizados con un lisado de *S. aureus*.

El porcentaje de proliferación inducido por *S. aureus* en los distintos grupos experimentales se evaluó por CF. Cuando células mononucleares de bazo de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales fueron re-estimuladas con el lisado de *S. aureus*, aquellas pertenecientes a los grupos *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1* mostraron una mayor linfoproliferación (representado por el % de células CFSE positivas) respecto a las células pertenecientes a los grupos *Lisado*, *Lisado + Lip + Rg1* y *Control* ($p < 0,05$) (Figura 22).

En relación al control positivo, cuando las células mononucleares de ratones provenientes de los diferentes grupos experimentales fueron estimuladas con Con A, la linfoproliferación fue mayor en todos los grupos experimentales respecto a las células basales de cada grupo (Anexo II).

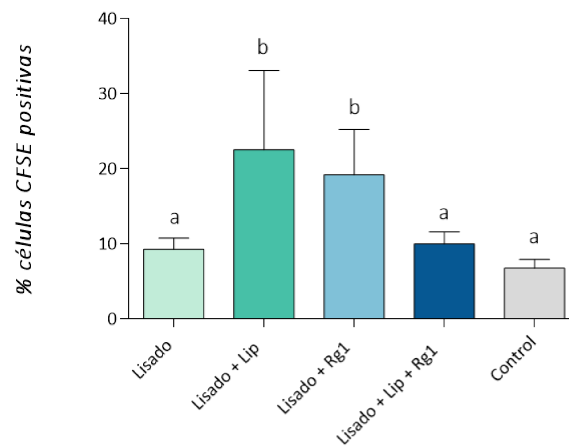


Figura 22. Proliferación de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de lisado de *S. aureus* (% células CFSE positivas). Los resultados fueron expresados como la media del % CFSE de los diferentes grupos experimentales estimulados con lisado *S. aureus* \pm EEM (n = 8). Letras distintas denotan diferencias significativas entre grupos experimentales ($p < 0,05$).



5. DISCUSIÓN

5.1. Evaluación del potencial inmunomodulatorio de Rg1 en células bovinas *in vitro*.

El ginsenósido Rg1 participa en múltiples actividades biológicas características de la RI innata, como producción de citoquinas proinflamatorias, fagocitosis, liberación de ROS y expresión de moléculas coestimuladoras entre otras (Joo *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2016b; Huang *et al.*, 2017). En esta tesis se estudió el potencial inmunomodulatorio de Rg1 en células MAC-T y en células mononucleares aisladas de secreción mamaria y de sangre periférica bovina.

Los inmunomoduladores son sustancias biológicas o sintéticas capaces de modular, estimular o suprimir diferentes puntos del sistema inmune tanto de la respuesta innata como adaptativa (Kumar *et al.*, 2012). Una de las principales características descritas por Quinn (1990), antigua pero aún vigente, es que estas sustancias no deben ser tóxicas. Por lo tanto, en este trabajo se decidió evaluar el efecto de Rg1 en la viabilidad de cultivos celulares bovinos empleando el kit de proliferación XTT, basado en medición de la actividad metabólica celular. Las células MAC-T fueron tratadas con diferentes concentraciones de Rg1 (10 a 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 2, 6 y 24 hs. Considerando que Rg1 no modificó la viabilidad de las células MAC-T en ninguna de las condiciones evaluadas, para estudiar la viabilidad de MSMC y de leucocitos de sangre periférica, se decidió aumentar la concentración de Rg1 (250 $\mu\text{g/ml}$) y analizar este efecto en el mayor tiempo de incubación propuesto (24 hs). Al igual que las MAC-T, los resultados demostraron que la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de Rg1 no afectó la viabilidad de células de secreción mamaria ni de sangre periférica luego de 24 hs de tratamiento. En concordancia con estos resultados, Wang *et al.* (2014) demostraron que Rg1 (3,7 a 300 μM) no generó cambios en la viabilidad de macrófagos RAW 264.7 luego de 24 y 48 hs de tratamiento. Recientemente, Bi *et al.* (2019) demostraron que el pre-tratamiento de linfocitos de pollo con diferentes concentraciones de Rg1 (50 a 90 $\mu\text{g/ml}$) mejoró significativamente la viabilidad celular, redujo el porcentaje de células apoptóticas y disminuyó el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 . Por otro lado, considerando que Rg1 es uno de los principales compuestos activos del extracto de *Pg* (Sun *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2020), Beccaria *et al.* (2018) demostraron que la viabilidad celular de MAC-T y macrófagos aislados de secreción mamaria no estuvo afectada por el tratamiento con diferentes concentraciones de un extracto de raíz de *Pg* (0,5 a 3 mg/ml) luego de 2, 8 y 24 hs. Estos resultados confirman que Rg1 no es tóxico para células bovinas en las concentraciones utilizadas.

Considerando que los TLRs tienen un rol crítico en la RI innata en mamíferos (Werling *et al.*, 2017) e hipotetizando que Rg1 actuaría en las células a través de estos receptores, particularmente TLR2 y TLR4, se evaluó el efecto de Rg1 en la expresión génica y proteica de TLR2 y TLR4 en células bovinas. En relación a los niveles de expresión de ARNm, los resultados obtenidos por qPCR mostraron que Rg1 (250 µg/ml) fue capaz de inducir la expresión tanto de TLR2 como la de TLR4 en MSCM luego de 8 hs de tratamiento, siendo estadísticamente significativo para TLR4. En relación a la expresión proteica para ambos receptores, los resultados obtenidos por CF mostraron que Rg1 (250 µg/ml) también fue capaz de inducir, de manera significativa, la expresión de TLR2 y TLR4 tanto en MSCM como en PBMC luego de 24 hs de tratamiento. Estos resultados sugieren que Rg1 podría interactuar con TLR4 e inducir la activación de las vías de señalización de este receptor. En concordancia, Su *et al.* (2012) han demostrado que los ginsenósidos Rg1 y Re inducen su actividad mediante la vía de señalización de TLR4 en células RAW-Blue™ (derivadas de macrófagos RAW264.7) pre-tratadas con un anticuerpo bloqueante anti-TLR4 y luego expuestas a Rg1 o Re. Además, estos autores obtuvieron resultados similares en un modelo *in vivo* en ratones C3H/HeJ (deficientes en el gen TLR4, *tlr4*^{-/-}), demostrando que la capacidad adyuvante de los ginsenósidos depende de la vía de TLR4. Sumado a esto, Su *et al.* (2015) observaron la localización de Rg1 y Re en el citoplasma de células RAW264.7 y activación de la señalización intracelular por parte de TLR4 hasta las 6 hs luego del tratamiento con estos compuestos. Por otro lado, se ha reportado que el extracto de *Pg* interactúa con los TLRs, especialmente con TLR4, e induce la expresión de mediadores proinflamatorios (Nakaya *et al.*, 2004). En este sentido, Baravalle *et al.* (2015) han demostrado que la inoculación intramamaria de *Pg* indujo una mayor expresión tanto génica como proteica de TLR2 y TLR4 en cuartos mamarios bovinos. Por su parte, Panacci *et al.* (2006) han observado que la administración oral de *Pg* (G115) indujo un incremento en la expresión de ARNm de TLR4 estimulando la RI de forma gradual en macrófagos peritoneales de ratones físicamente estresados. Sin embargo, para confirmar si Rg1 actúa sobre las células bovinas a través de TLR2 y/o TLR4 e inicia las vías de señalización, la realización de ensayos *in vitro* en células bovinas empleando anticuerpos bloqueantes específicos o la metodología de silenciamiento génico, permitirán conocer con mayor precisión cómo Rg1 interactúa con las células y ejerce sus funciones.

La interacción TLR-ligando inicia una cascada de señalización que conduce a la activación de NFκB y consecuente producción de citoquinas proinflamatorias (Thompson-Crispi *et al.*, 2014). Considerando que las CEM y los macrófagos son las primeras células en enfrentarse a los patógenos cuando ingresan a la GM bovina (Thompson-Crispi *et al.*, 2014) y que, Rg1 regula la RI innata en macrófagos mediante la modulación diferencial de la producción de citoquinas

inflamatorias (Park *et al.*, 2015), se decidió estudiar el efecto de Rg1 en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias en MAC-T y en MSMC. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que Rg1 (50 µg/ml) fue capaz de inducir la expresión génica de TNFα, IL-6 e IL-8 en MSMC luego de 24 hs de tratamiento, siendo estadísticamente significativa para IL-6 e IL-8. Sin embargo, Rg1 no fue capaz de inducir la expresión génica de NFκB, TNFα e IL-6 en células MAC-T. Se considera que la falta de respuesta en las células MAC-T podría deberse a que la concentración de Rg1 empleada no fue suficiente. Si bien las células MAC-T son capaces de producir citoquinas (Khaled *et al.*, 2007; Günther *et al.*, 2011; Beccaria *et al.*, 2018) es probable que necesiten una concentración o tiempo de estímulo mayor a los empleados en las MSMC. Los resultados obtenidos en MSMC podrían sugerir la inducción de un posible perfil proinflamatorio por parte de Rg1 en células de secreción mamaria, en concordancia con el efecto proinflamatorio del extracto de *Pg* demostrado previamente tanto en modelos *in vivo* e *in vitro* por nuestro grupo de investigación (Baravalle *et al.*, 2015; Silvestrini *et al.*, 2017; Beccaria *et al.*, 2018).

El perfil inflamatorio de Rg1 ha sido ampliamente estudiado. Ciertos autores postulan a Rg1 como un compuesto proinflamatorio. En este sentido, Joo *et al.* (2005) han informado que concentraciones de Rg1, similares a las estudiadas en este trabajo (50 – 250 µg/ml), aumentaron la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias, específicamente IL-1β, IL-6 y TNFα, de manera dosis-dependiente en cultivos de microglia en comparación con células sin tratar, hasta 48 hs de post-tratamiento. Además, Huang *et al.* (2017) han reportado que Rg1 indujo la secreción de citoquinas como IL-1β, IL-6 y TNFα y de quimioquinas como IL-8 e IP-10, de manera dosis-dependiente, en CDs humanas derivadas de PBMC. Sin embargo, otros autores han encontrado que Rg1 atenúa la respuesta proinflamatoria, postulando a Rg1 como un compuesto antiinflamatorio. En este contexto, se encuentra reportado que Rg1 disminuyó los niveles de expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6 y TNFα) en diferentes modelos experimentales de inflamación inducida (Tao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015; Ning *et al.*, 2018). Sumado a esto, Li *et al.* (2018b) reportaron que Rg1 inhibió la activación de NFκB, lo que contribuyó a disminuir la transcripción de genes asociados a la inflamación, entre ellos, los de las citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, Su *et al.* (2015) demostraron que, en un modelo de sepsis inducido por LPS, los ginsenósidos Rg1 y Re inhibieron la expresión de ARNm y la producción de mediadores proinflamatorios como TNFα, IL-1β e IL-6 de macrófagos debido a que la interacción Rg1-TLR4, disminuyó la disponibilidad del receptor. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y a los reportados por los autores mencionados, se considera necesario continuar con el estudio del mecanismo de acción

de Rg1 y la evaluación de la expresión de otras citoquinas y otros mediadores antiinflamatorios para poder definir el rol proinflamatorio/antiinflamatorio de Rg1 en células bovinas.

Por otro lado, además del aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias, entre otros mecanismos, la activación mediada por los TLRs da como resultado, un aumento de las actividades bactericidas, como fagocitosis y producción de ROS, las cuales son esenciales para iniciar y mantener la RI innata desencadenada (Beamer y Shepherd, 2012). La fagocitosis llevada a cabo por fagocitos profesionales, como monocitos, macrófagos y neutrófilos, es el principal mecanismo efector por el cual *S. aureus* es controlado por el sistema inmune (Pollitt *et al.*, 2018). Por lo tanto, con el fin de evaluar el efecto de Rg1 en la activación de células de secreción y sangre expuestas a *S. aureus*, se incubaron las células bovinas con la cepa 5011 de *S. aureus* marcada con FITC y luego se determinó la producción intracelular de ROS. Los resultados obtenidos mostraron que Rg1 aumentó considerablemente la producción de ROS en MSMC y PBMC con bacterias adheridas y/o internalizadas. En relación a estos resultados, Xin *et al.* (2019a, b) demostraron que otros ginsenósidos como Rg3 y Rb1 fueron capaces de estimular la fagocitosis de monocitos/macrófagos murinos. También se encuentra reportado para los compuestos 20S-dihydroprotopanaxadiol (2H-PPD, un derivado del protopanaxadiol) y CK (componente bioactivo del ginsenósido Rb1), además de la actividad fagocítica, la estimulación de células RAW264.7 a través de un aumento en la producción de ROS (Kim y Cho, 2013; Yang *et al.*, 2017). Considerando lo descrito por otros autores en conjunto a los resultados obtenidos en este ensayo, se podría postular que Rg1 fue capaz de activar la función innata microbicida (estallido respiratorio) de monocitos y macrófagos bovinos, favoreciendo indirectamente la fagocitosis de *S. aureus* en células bovinas. A su vez, la activación de los receptores TLR2 y 4, dada por el aumento en la expresión proteica detectada por CF, podría relacionarse directamente al aumento en la producción de ROS obtenidos en ambos tipos celulares evaluados. Por otro lado, la evaluación de ON producido por ambos cultivos celulares tratados con Rg1 y luego expuestos a *S. aureus*, como medida alternativa de activación, podría arrojar información importante y complementaria para los resultados obtenidos.

Considerando la importante función que tienen los macrófagos en la inducción de la RI adaptativa, se decidió evaluar el efecto de Rg1 en la activación de monocitos y macrófagos bovinos. Para llevar a cabo este objetivo, se evaluó la expresión de CMH-II y CD80 en células CD14⁺ en secreción y sangre periférica. Luego de la activación, los macrófagos modulan la expresión de CD14 (Rhule *et al.*, 2006) y expresan altos niveles de CMH-II para la presentación antigénica a los linfocitos Th (Kang y Min, 2012). Además, los macrófagos regulan positivamente la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), dando la segunda señal necesaria para potenciar la interacción entre las CMH-II y el receptor de linfocitos T (Lee *et al.*, 2007).

En secreción mamaria, los resultados obtenidos en esta tesis, mostraron que Rg1 (250 $\mu\text{g/ml}$) no fue capaz de inducir la expresión de CMH-II y CD80 en MSMC luego de 24 hs de tratamiento. La escasa activación de estas células luego de la estimulación con Rg1 o con activadores específicos (como LPS o LTA) podría deberse a que los macrófagos, aislados de secreción mamaria a los 14 días del periodo de involución, se encontrarían comprometidos en el proceso normal de remodelación, fagocitando restos de grasa, caseína y otros compuestos de la leche (Sordillo y Babiuk, 1991; Sordillo, 2018). Sin embargo, en sangre periférica, se pudo demostrar la capacidad de activación de los monocitos, corroborando el funcionamiento de los modelos experimentales evaluados. A pesar de que el porcentaje de células CD14 fue menor en monocitos estimulados con Rg1 (250 $\mu\text{g/ml}$) luego de 24 hs de tratamiento comparado con monocitos basales, mostraron mayores porcentajes de expresión de CMH-II y CD80 respecto a ellos, sugiriendo un posible efecto de Rg1 en la activación de dichas células. Resultados similares fueron obtenidos en CDs derivadas de PBMC donde Rg1 estimuló la expresión de moléculas de superficie como CD80, CD83 y antígeno leucocitario humano (HLA-DR) y disminuyó la expresión de CD14, demostrando así la capacidad de Rg1 para estimular la RI adaptativa activando las CPA (Huang *et al.*, 2017). La capacidad de Rg1 de promover la expresión de moléculas coestimuladoras fue descrita también en otros compuestos derivados de los ginsenósidos como por ejemplo 2H-PPD y CK. Tanto el 2H-PPD como el CK aumentaron la expresión superficial de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células RAW264.7 (Kim y Cho, 2013; Yang *et al.*, 2017). Por el contrario, Rhule *et al.* (2006) mostraron que el notoginsenósido Rg1 redujo la expresión de las moléculas accesorias CD40 y CD86 pero que no tuvo ningún efecto en la expresión de TLR4 y CD14 en células RAW264.7 estimuladas con LPS. La discrepancia entre los resultados encontrados podría deberse, en primera instancia, a los diferentes estímulos utilizados. Por otro lado, considerando las condiciones experimentales, si bien los tiempos de estimulación fueron similares en el trabajo de Rhule *et al.* (2006) con el ensayo en este trabajo (24 hs), los primeros autores utilizaron una menor concentración de Rg1 (50 $\mu\text{g/ml}$) en comparación a la utilizada en este ensayo (250 $\mu\text{g/ml}$). Considerando los resultados obtenidos en esta tesis en células bovinas sanguíneas, Rg1 actuaría como un iniciador de la RI innata, debido al aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras observado en monocitos/macrófagos luego del tratamiento con este inmunomodulador. Por lo tanto, sería interesante poder evaluar *in vitro* el rol de Rg1 en la inducción de la RI adaptativa mediante co-cultivos de monocitos previamente activados con Rg1 y enfrentados con diversos patógenos y linfocitos T.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que Rg1 no tuvo un efecto citotóxico en células bovinas. Además, Rg1 indujo la expresión proteica de los receptores TLR2 y TLR4 y fue

capaz de inducir la activación de células mononucleares de secreción y sangre, mediante el aumento en la producción de ROS, en ambos tipos celulares, y en la expresión de las moléculas coestimuladoras CMH-II y CD80, en monocitos. En conjunto, estos resultados demuestran parcialmente el efecto inmunomodulador de Rg1 en células bovinas. Sin embargo, considerando la escasa información publicada en la especie hasta el momento, los resultados obtenidos en esta tesis sientan precedencia y sirven como base para nuevos ensayos que permitan dilucidar el rol de Rg1 en la inmunomodulación de la GM bovina.

5.2. Evaluación de la capacidad adyuvante de Rg1 en un modelo murino *in vivo*.

La mastitis bovina es una de las enfermedades infecciosas de los rodeos lecheros más comúnmente tratada con antibióticos (Montforts, 2005). Sin embargo, la tasa de curación de la terapia antibiótica contra *S. aureus* es baja por factores que dependen del microorganismo, del antibiótico y del hospedador (Barkema *et al.*, 2006). Actualmente, las inmunoterapias veterinarias buscan satisfacer la necesidad de reducir el uso de antibióticos, minimizando su impacto ambiental, efectos secundarios y residuos en los productos de la cadena alimentaria, mejorando la salud y la productividad de los animales (Parra *et al.*, 2020). En este sentido, la utilización de inmunomoduladores de origen vegetal están siendo mundialmente estudiados (Yuan *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014a, b; Zhao *et al.*, 2014; Baravalle *et al.*, 2010, Baravalle *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015 a,b; Díaz-Murillo *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; Silvestrini *et al.*, 2017; Beccaria *et al.*, 2018). Dentro de las moléculas con potencial actividad moduladora, el ginsenósido Rg1 es uno de los compuestos más importantes del extracto de *Pg* (Yu *et al.*, 2016), y presenta mayor poder adyuvante que el resto de los ginsenósidos reportados hasta el momento (Rg3, Rd, Rc, Rb1, Rb2, Rg1, Re y Rg2) (Sun *et al.*, 2007). En base a la evidencia acumulada, en esta tesis se evaluó la capacidad adyuvante de Rg1 solo o en combinación con liposomas determinando la RI humoral y celular en un modelo murino de inmunización con un lisado de *S. aureus*.

En primera instancia, se evaluó el efecto adyuvante de Rg1 en la RI humoral inducida por BSA como antígeno modelo. Las albúminas séricas, como ovoalbúmina (OVA) o BSA, son capaces de desencadenar una fuerte respuesta inmunológica cuando son administradas en otra especie (Bujacz, 2012). Su *et al.* (2012) demostraron que los ginsenósidos Rg1 y Re incrementó la respuesta de IgG específica contra OVA en suero de ratones C3H/HeB (tlr4^{+/+}). Resultados similares se obtuvieron en el ensayo 2 cuando se evaluó la respuesta anti-BSA en ratones. Los

animales inmunizados con *BSA + Rg1* produjeron mayores niveles de IgG total respecto a los grupos *BSA*, *BSA + Lip* y *BSA + Rg1 + Lip*.

El empleo de la combinación *Lisado + Liposomas + Rg1* en las inmunizaciones realizadas se propuso planteando la hipótesis de que Rg1, al ser una saponina, puede fusionarse con los liposomas catiónicos, compuestos por Chol, DPPC y SA, formando un complejo de características similares a los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs, del inglés *immunostimulating complexes*). Dichos compuestos son sistemas de *delivery* de antígenos, compuestos por colesterol, fosfolípidos y saponinas derivadas de la *Quillaja saponaria*, capaces de inducir fuertes RI celulares y/o humorales específicas frente a una amplia gama de antígenos, en diferentes modelos animales (Sjölander *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2009b; Camussone *et al.*, 2014).

En este trabajo, el efecto adyuvante de Rg1 en la RI humoral inducida por *S. aureus* fue evaluada mediante la determinación de la producción de anticuerpos específicos en plasma de ratones inmunizados con diferentes formulaciones en combinación con un lisado de *S. aureus*. Clásicamente, el desarrollo de vacunas contra *S. aureus* se ha centrado en la estimulación de la RI humoral debido a la importancia que esta respuesta tiene en la eliminación de infecciones (den Reijer *et al.*, 2013). En ratones, la IgG constituye la mayor fracción sérica de anticuerpos y presenta cuatro isotipos (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) (Temming *et al.*, 2020). Si bien los resultados obtenidos en el ensayo 3 del presente trabajo se consideraron preliminares, los mismos mostraron que el título de IgG total en plasma de ratones inmunizados con *Lisado + IFA* y *Lisado + Lip + Rg1* fue mayor al obtenido en plasma de ratones inmunizados con *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1*, sugiriendo que la combinación liposoma + Rg1 podría potenciar la RI humoral de manera similar a la inducida por IFA. Por otra parte, en el ensayo 4 del presente trabajo de tesis, el título de IgG total en plasma de ratones inmunizados con *Lisado + Lip*, *Lisado + Rg1* y *Lisado + Lip + Rg1* fue similar entre los grupos y significativamente superior al obtenido en plasma de ratones inmunizados con *Lisado*. Este resultado indica que si bien la combinación *Lisado + Lip + Rg1* no potencia la RI humoral específica, tampoco la perjudica. Es importante destacar que, si bien se observaron diferencias en los títulos de IgG total en los grupos inmunizados con *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1* entre los ensayos 3 y 4, no es posible realizar comparaciones directas, debido a las diferentes características de los inóculos empleados y a las condiciones en las cuales se desarrollaron los experimentos. Por un lado, en cada ensayo se utilizaron diferentes lotes de lisado y liposomas. Por otro lado, en relación a Rg1, si bien las características moleculares y químicas de los compuestos empleados fueron idénticas, se utilizaron dos marcas comerciales diferentes. En relación a los reactivos biológicos empleados, si bien los ratones pertenecían a la misma cepa y fueron endocriados, provenían de diferentes instituciones lo que implica

variaciones en las condiciones de alojamiento. Otro punto a tener en cuenta en relación a las diferencias observadas entre ensayos es que el título obtenido en el ensayo 3 fue calculado en relación al grupo control, debido a los elevados valores obtenidos en los sueros preinmunes, mientras que, el que el título obtenido en el ensayo 4 fue calculado en relación al suero preinmune de cada grupo.

Es importante destacar que en el ensayo 4 la mayoría de los grupos experimentales mostraron títulos de anticuerpos 4 o 5 veces superiores a los obtenidos en el ensayo 3, por lo tanto estos resultados fueron considerados para una discusión más exhaustiva. En el ensayo 4, los títulos de IgG similares obtenidos en los grupos *Lisado + Lip*, *Lisado + Rg1* y *Lisado + Lip + Rg1*, prueban la capacidad de Rg1 de inducir la producción de anticuerpos de manera similar a la inducida por los liposomas, previamente demostrada por Reidel *et al.* (2017). Coincidentemente con estos resultados, otros autores han demostrado la capacidad de Rg1 de favorecer la producción de anticuerpos específicos contra diferentes antígenos de origen viral o proveniente de patógenos intracelulares. Yuan *et al.* (2016) demostraron que los niveles de IgG obtenidos en plasma de ratones Balb/c inmunizados con el HBsAg + Rg1 (50 µg) fueron significativamente mayores en comparación con los obtenidos en ratones hembras inmunizadas solo con HBsAg. Por su parte, Qu *et al.* (2011) demostraron que los niveles de IgG en ratones hembras ICR inmunizadas con el antígeno de superficie 1 de *Toxoplasma gondii* recombinante (rSAG1) + Rg1 (50 y 100 µg) fueron significativamente mayores en comparación con los obtenidos en el grupo control.

Adicionalmente, se evaluó el isotipo IgG2a. Los resultados obtenidos en el ensayo 4 mostraron una tendencia similar a IgG total. Es decir, los plasmas de ratones inmunizados con lisado formulado con liposoma o Rg1, o la combinación de ambos, mostraron títulos de IgG2a mayores al plasma de ratones inmunizados solo con lisado, siendo estadísticamente diferente solo cuando se formuló con el liposoma. Esto sugiere la capacidad de Rg1 de inducir la producción de IgG2a de manera similar a los liposomas. Sin embargo, si se consideran en conjunto los títulos de IgG2a obtenidos en los diferentes grupos *Lisado + Lip*, *Lisado+ Rg1* y *Lisado + Lip + Rg1* en comparación a los títulos de IgG total, fueron considerablemente menores a los títulos de IgG. Estos resultados sugirieron que IgG2a no sería el responsable del aumento de IgG total encontrado en los diferentes grupos experimentales. Contradictoriamente con los resultados obtenidos para IgG2a en este trabajo, tanto Yuan *et al.* (2016) como Qu *et al.* (2011) coincidieron en la capacidad de Rg1 de favorecer la producción de los isotipos IgG1 e IgG2a en ratones inmunizados con HBsAg + Rg1 (50 µg) y rSAG1 + Rg1 (50 y 100 µg), respectivamente, asegurando la participación de Rg1 en la inducción de los perfiles Th1 y Th2. Por lo tanto, será

necesario evaluar en futuros ensayos la función de Rg1 en la inducción de la RI humoral evaluando los isotipos IgG1 e IgG2b en ratones inmunizados con lisado de *S. aureus*.

Si bien durante los últimos 40 años, diversos grupos de investigación han desarrollado una variedad de inmunógenos experimentales contra mastitis por *S. aureus*, ninguno de ellos ha resultado completamente eficaz en prevenir la infección por este microorganismo (Scali *et al.*, 2015). De estos desarrollos, solamente dos vacunas constituidas por lisados bacterianos o células enteras formuladas con adyuvantes clásicos están actualmente disponibles comercialmente (Middleton *et al.*, 2009; Prenafeta *et al.*, 2010). Uno de los motivos propuestos por los cuales los inmunógenos evaluados hasta el momento contra *S. aureus* no han resultado completamente eficaces, es que una protección adecuada no se lograría solamente con la estimulación de una RI humoral, sino que también debería estar acompañada de una respuesta local mediada por células (Middleton, 2008). La estimulación de linfocitos T CD4 capaces de producir IFN γ en respuesta al encuentro con el patógeno, ha sido propuesta como una de las claves para la erradicación de los estafilococos intracelulares a través de la activación de células fagocíticas (Gómez *et al.*, 2002). Considerando estos antecedentes, en este trabajo, se evaluó el efecto adyuvante de Rg1 en la inducción de la RI celular inducida por *S. aureus* mediante ensayos de linfoproliferación celular.

El bazo es el órgano linfático periférico en donde se inicia y desarrolla la RI adaptativa (Moser y Leo, 2010). Luego de la activación linfocitaria, ocurre la proliferación o expansión clonal con el fin de generar suficientes linfocitos T efectores específicos capaces de erradicar la infección (Abbas, 2012). Los resultados preliminares obtenidos en el ensayo 3 mostraron que las células de bazo provenientes de animales inmunizados con *Lisado + IFA* y *Lisado + Lip* fueron capaces de proliferar en mayor medida, independientemente de la concentración de lisado empleada en la re-estimulación, comparado con las células de bazo provenientes de los grupos que contenían el Rg1 y control. Si bien varios autores muestran la capacidad de Rg1 de estimular la proliferación a partir de las 48 hs (Su *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2016b; Huang *et al.*, 2017), se consideró que el tiempo de re-estimulación con el antígeno específico utilizado en el presente trabajo (72 hs) no fue suficiente para lograr la expansión clonal de las células. Por este motivo, en el ensayo 4 se decidió re-estimular a las células durante 120 hs (Yuan *et al.*, 2010). Además, en este mismo ensayo, la RI celular específica para *S. aureus* se evaluó mediante la tinción de las células de bazo con CFSE. El uso del CFSE para medir linfoproliferación por CF se ha convertido en uno de los ensayos ampliamente utilizados para evaluar las respuestas de los linfocitos (Quah y Parish, 2012). Los resultados del ensayo 4 muestran que el porcentaje de proliferación (células CFSE positivas) del grupo *Lisado + Lip* y *Lisado + Rg1* fue mayor al del grupo *Lisado* y *Lisado + Lip + Rg1*, lo que sugiere que Rg1 fue capaz de inducir linfoproliferación

de igual manera que los liposomas, favoreciendo la inducción de la RI celular contra *S. aureus*. Estos resultados coinciden con varios reportes en los que se comprueba la capacidad de Rg1 de estimular la RI celular frente a diferentes antígenos. Sun *et al.* (2007) demostraron que Rg1 mejoró la respuesta proliferativa de esplenocitos re-estimulados con Con A, LPS y OVA luego de la estimulación con OVA en ratones inmunizados con OVA + Rg1. En otro ensayo, Qu *et al.* (2011) demostraron la capacidad de Rg1 de inducir la proliferación de esplenocitos re-estimulados con rSAG1 provenientes de ratones ICR inmunizados con rSAG1 + Rg1 (50 y 100 µg). Por su parte, Huang *et al.* (2017) demostraron que Rg1 mejoró la proliferación de esplenocitos específicos para OVA en ratones C57BL/6. En relación a la baja respuesta proliferativa observada en el grupo *Lisado + Lip + Rg1* podría inferirse que la combinación de ambos adyuvantes no sería eficiente para inducir RI celular frente a *S. aureus* en un modelo *in vivo*.

Las citoquinas juegan un papel importante en la defensa del huésped contra los microorganismos y son importantes para iniciar, amplificar, dirigir, mediar y regular la inmunidad adaptativa (Holdsworth y Can, 2015). Las citoquinas secretadas por las células activadas permiten la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia diferentes subpoblaciones Th. Así, el IFN γ induce la diferenciación de las células T CD4 vírgenes en células Th1 e inhibe la proliferación de las células Th2. Por otro lado, IL-4 e IL-10 inducen la diferenciación de las células T CD4 vírgenes a células Th2 e inhiben la función de las células Th1 (Lee *et al.*, 2004). Es por esto que se consideró importante evaluar el perfil de citoquinas inducido por Rg1 en células de bazo, provenientes de ratones pertenecientes a los diferentes grupos experimentales, re-estimuladas con el lisado bacteriano (ensayo 3 realizado en el Laboratorio de Inmunología, UQAM). Si bien este ensayo fue preliminar, cabe resaltar que las células de bazo provenientes de los grupos inmunizados con *Lisado + Rg1* y *Lisado + Lip + Rg1* produjeron mayores niveles de IFN γ respecto al grupo *Control* luego de la re-estimulación con lisado de *S. aureus* (10 µg/ml). En cuanto a la producción de IL-4 por las células de bazo re-estimuladas, no pudo detectarse en ninguno de los grupos. Considerando estos resultados y que *S. aureus*, a pesar de ser un patógeno reconocido como extracelular, es capaz de sobrevivir, persistir y replicarse en el interior de las células (Musilova *et al.*, 2019; Sacco *et al.*, 2020), podría sugerirse que Rg1 favorecería el desarrollo de una RI tipo Th1. Esta estimación coincide con lo publicado por Huang *et al.* (2017), quienes han reportado un aumento en la secreción de IFN γ e IL-2 en ratones inmunizados con OVA + Rg1. Además, Sun *et al.* (2007) han mostrado un aumento en la producción de IFN γ e IL-5 en cultivos celulares provenientes de ratones inmunizados con OVA + Rg1. Podría evaluarse la presencia de otras citoquinas, como IL-12 o TNF α , y alguna función efectora en los linfocitos, para garantizar la inducción de linfocitos T CD4 al perfil Th1 por parte

de Rg1. Sin embargo, existen reportes en los que se demuestra que Rg1 actúa como adyuvante para promover tanto la respuesta Th1 como Th2 (Sun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). Qu *et al.* (2011) demostraron que células de bazo de ratones inmunizados con rSAG1 formulado con diferentes dosis de Rg1 produjeron elevados niveles IL-4 e IFN γ . La discrepancia en lo hallado por estos autores y este trabajo podría deberse al antígeno empleado en las inmunizaciones, proteína recombinante rSAG1 vs. lisado bacteriano de la cepa 5011 de *S. aureus* (el cual contiene una gran diversidad de antígenos). Considerando los antecedentes mencionados, se considera necesario continuar con la evaluación del posible perfil Th1 inducido por Rg1 luego de una infección con *S. aureus*.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la combinación Lip + Rg1 fue capaz de estimular la producción de anticuerpos (IgG e IgG2a) contra *S. aureus*, en igual magnitud que la inducida cuando los ratones fueron inoculados con Rg1 o Lip por separado. Además, considerando que la proliferación celular fue menor con la combinación Lip + Rg1 en relación a la observada para ambos adyuvantes por separado, se podría inferir que tal combinación no tendría ninguna ventaja en la inducción de la RI celular frente a *S. aureus* en el modelo experimental evaluado en el presente trabajo de tesis.

Si bien los resultados obtenidos no son suficientemente concluyentes para postular a Rg1 como un potencial adyuvante en vacunas contra *S. aureus*, se considera que la participación de Rg1 en la estimulación de la RI quedó demostrada mediante la producción de anticuerpos específicos contra *S. aureus* y la inducción de linfoproliferación en animales inmunizados con *Lisado + Rg1*.



6. CONCLUSIONES

En relación a la evaluación del *efecto inmunomodulatorio* de Rg1 en cultivos celulares bovinos, los resultados obtenidos muestran que:

→ En células MAC-T, MSMC y leucocitos de sangre periférica, Rg1 no afectó la viabilidad de los cultivos celulares luego de 24 hs de tratamiento.

→ En células MAC-T, Rg1 no modificó la expresión génica de TLR4, NFκB, TNFα e IL-6.

→ En MSMC, Rg1 (250 µg/ml) aumentó la expresión génica de TLR2 y TLR4 luego de 8 hs de tratamiento. En MSMC y PBMC, Rg1 (250 µg/ml) aumentó la expresión proteica de ambos receptores luego de 24 hs de tratamiento.

→ En MSMC, Rg1 (50 µg/ml) aumentó la expresión génica de IL-6 e IL-8 luego de 24 hs de tratamiento.

→ En MSMC y PBMC, Rg1 (250 µg/ml) aumentó la producción de ROS luego del co-cultivo con *S. aureus*.

→ En PBMC, Rg1 (250 µg/ml) aumentó el porcentaje de expresión de las moléculas coestimuladoras CMH-II y CD80 luego de 24 hs de tratamiento. Sin embargo, la misma concentración empleada en MSMC no fue suficiente para inducir la expresión de las moléculas coestimuladoras.

En relación a la evaluación de la *capacidad adyuvante* de Rg1, formulado junto a liposomas en un modelo de inmunización *in vivo* en ratones, con un lisado de la cepa 5011 de *S. aureus*:

→ Rg1, inoculado solo o en combinación con liposomas, estimuló la RI humoral mediante la producción de anticuerpos IgG total anti-*S. aureus* de manera similar a la inducida por los liposomas.

→ Rg1 estimuló la RI celular mediante la inducción de la proliferación celular de manera similar a la inducida por los liposomas. Sin embargo, la proliferación inducida por la combinación liposomas-Rg1 fue similar a la inducida por los grupos Control y Lisado.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis, permiten concluir que *Rg1 tendría un posible efecto inmunoestimulante en células bovinas, induciendo la expresión de ciertos receptores de la inmunidad innata como TLR2 y TLR4 y consecuente producción de componentes inflamatorios como IL-6 e IL-8. Por otro lado, Rg1 induce la activación de células bovinas mediante el aumento en la producción intracelular de ROS y la expresión de moléculas coestimuladoras (CMH-II y CD80), sugiriendo estos resultados una posible inducción de la RI adaptativa. En relación a la evaluación de la capacidad adyuvante de Rg1, los resultados sugieren que la combinación liposoma-Rg1 no tendría ventajas en relación a la producción de anticuerpos específicos o la proliferación celular en una inmunización frente a los antígenos*

presentes en el lisado de S. aureus. Por lo tanto, en un modelo murino de inmunización con S. aureus, Rg1, por sí solo, es capaz de estimular la RI humoral y celular.

A pesar de los nuevos interrogantes y desafíos que quedaron planteados, el presente trabajo ha sido de utilidad para conocer más acerca del potencial inmunomodulador de Rg1 y su capacidad adyuvante, con el fin de utilizarlo como posible candidato en prototipos de vacuna contra mastitis bovina causada por *S. aureus*.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Litchman AH, Pillai S, Abbas L** (2012) *Inmunología Celular y Molecular*.
- Aitken SL, Corl CM y Sordillo LM** (2011) Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **16** 291–304.
- Akira S, Uematsu S y Takeuchi O** (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124** 783–801.
- Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto P V., Smith WL y Cullor JS** (2003) The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* **50** 105–111.
- Almeida PA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ y Oliver SP** (1996) *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science* **79** 1021–1026.
- An Z, Li J, Yu J, Wang X, Gao H, Zhang W, Wei Z, Zhang J, Zhang Y, Zhao J et al.** (2019) Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages. *Cell Cycle* **18** 2928–2938.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Baré O, Auron PE, Stevenson MA y Calderwood SK** (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry* **277** 15028–15034.
- Bannerman DD** (2009) Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of animal science* **87** 10–25.
- Baravalle C, Dallard BE, Ortega HH, Neder VE, Canavesio VR y Calvino LF** (2010) Effect of Panax ginseng on cytokine expression in bovine mammary glands at drying off. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **138** 224–230.
- Baravalle C, Dallard BE, Cadoche MC, Pereyra EAL, Neder VE, Ortega HH y Calvino LF** (2011) Proinflammatory cytokines and CD14 expression in mammary tissue of cows following intramammary inoculation of Panax ginseng at drying off. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **144** 52–60.
- Baravalle C, Silvestrini P, Cadoche MC, Beccaria C, Andreotti CS, Renna MS, Pereyra EAL, Ortega HH, Calvino LF y 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- κ B during early involution. *Research in Veterinary Science* **100**.
- Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil JG y Ote I** (2014) Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* **169** 74–79.
- Bardiau M, Caplin J, Detilleux J, Graber H, Moroni P, Taminiau B y Mainil JG** (2016) Existence of

- two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary Microbiology* **185** 1–6.
- Barkema HW, Schukken YH y Zadoks RN** (2006) Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* **89** 1877–1895.
- Beamer CA y Shepherd DM** (2012) Inhibition of TLR ligand- and interferon gamma-induced murine microglial activation by *Panax notoginseng*. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **7** 465–476.
- Beccaria C, Silvestrini P, Renna MS, Ortega HH, Calvino LF, Dallard BE y Baravalle C** (2018) *Panax ginseng* extract reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells but does not affect macrophages phagocytic activity. *Microbial Pathogenesis* **122** 63–72.
- Bekeredjian-Ding I, Stein C y Uebele J** (2015) The innate immune response against *Staphylococcus aureus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1–32.
- Bharathan M y Mullarky IK** (2011) Targeting mucosal immunity in the battle to develop a mastitis vaccine. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **16** 409–419.
- Bi S, Ma X, Wang Y, Chi X, Zhang Y, Xu W y Hu S** (2019) Protective Effect of Ginsenoside Rg1 on Oxidative Damage Induced by Hydrogen Peroxide in Chicken Splenic Lymphocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**.
- Bobbo T, Ruegg PL, Stocco G, Fiore E, Giancesella M, Morgante M, Pasotto D, Bittante G y Cecchinato A** (2017) Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **100** 4868–4883.
- Bogni C, Odierno L, Raspanti C, Giraudo J, Larriestra A, Reinoso E, Lasagno M, Ferrari M, Ducrós E, Frigerio C et al.** (2011) War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. 483–494.
- Booth J** (1975) Mastitis control in the field: some results of two large field trials. *Proc. Natl. Mastitis Counc* 19–31.
- Bougarn S, Cunha P, Harmache A, Fromageau A, Gilbert FB y Rainard P** (2010) Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clinical and Vaccine Immunology* **17** 1797–1809.
- Bramley A y Dodd FD** (1984) Reviews of the progress of dairy science: mastitis control–progress

- and prospects. *J. Dairy Res* 51–481.
- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I y Kagan JC** (2015) Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annual Review of Immunology* **33** 257–290.
- Bujacz A** (2012) Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **68** 1278–1289.
- Burakova Y, Madera R, McVey S, Schlup JR y Shi J** (2018) Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunology* **31** 11–22.
- Buzás K, Megyeri K, Miczák A, Fekete A, Degré M, Mándi Y y Rosztóczy I** (2004) Different staphylococcal strains elicit different levels of production of T-helper 1-inducing cytokines. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **51** 371–384.
- Calvinho LF** (2017) Mastitis bovina : evolución del control en Argentina y nuevos horizontes de investigación. En *Anuales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, pp 148–163.
- Calvinho LF y Tirante L** (2005) Prevalencia de Microorganismos Patógenos de Mastitis Bovina y Evolución del Estado de Salud de la Glándula Mamaria en Argentina en los Ultimos 25 Años. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias* **4** 29–40.
- Campbell JJ, Botos LA, Sargeant TJ, Davidenko N, Cameron RE y Watson CJ** (2014) A 3-D in vitro co-culture model of mammary gland involution. *Integrative Biology (United Kingdom)* **6** 618–626.
- Camussone CM, Veaute CM, Pujato N, Morein B, Marcipar IS y Calvinho LF** (2014) Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. *Research in Veterinary Science* **96** 86–94.
- Choi YH, Jin GY, Li GZ y Yan GH** (2011) Cornuside suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators by inhibiting nuclear factor-kappa B activation in RAW 264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **34** 959–966.
- Concha C, Hu S y Holmberg O** (1996) The proliferative responses of cow stripping milk and blood lymphocytes to pokeweed mitogen and ginseng in vitro. *BioMed Central* **27** 107–115.
- Cooper JF y Pearson SM** (1977) Detection of endotoxin in biological products by the limulus test. *Developments in Biological Standardization* **34** 7–13.
- Corbellini CN** (2002) La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. 1–12.
- Dallard BE y Calvinho LF** (2010) Receptore tipo “toll” en la inmunidad innata y su rol durante la infección intramamaria por *Staphylococcus aureus*. *Revista FAVE* **9** 37–50.
- Dallard BE, Baravalle C, Andreotti C, Ortega HH, Neder V y Calvinho LF** (2011) Intramammary inoculation of Panax ginseng extract in cows at drying off enhances early mammary involution. *Journal of Dairy Research* **78** 63–71.

- Dallard BE, Pujato SA, Baravalle C, Pereyra EAL, Rey F, Renna MS y Calvino 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. *Research in Veterinary Science* **94** 462–470.
- Díaz-Murillo V, Medina-Estrada I, López-Meza JE y Ochoa-Zarzosa A** (2016) 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, Bogno CI, Larriestra AJ y Odierno LM** (2014) Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pakistan Veterinary Journal* **34** 124–126.
- Dunzendorfer S, Lee H-K, Soldau K y Tobias PS** (2004) TLR4 Is the Signaling but Not the Lipopolysaccharide Uptake Receptor. *The Journal of Immunology* **173** 1166–1170.
- Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OFM, Espevik T y Sundan A** (2002) Inflammatory response after open heart surgery: Release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* **105** 685–690.
- Eberhart RJ** (1986) Management of Dry Cows to Reduce Mastitis. *Journal of Dairy Science* **69** 1721–1732.
- Esen N, Tanga FY, DeLeo JA y Kielian T** (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *Journal of Neurochemistry* **88** 746–758.
- Eubanks Ryman V, Packiriswamy N y Sordillo LM** (2015) Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. *Anim Health Res Rev* **16** 135–149.
- Fonseca I y Silva P** (2009) Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genet Mol Biol* **32** 776–781.
- Fu Y, Liu B, Feng X, Li F, Liang D, Liu Z, Li D, Cao Y, Zhang X, Zhang N et al.** (2012) The effect of magnolol on the toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *European Journal of Pharmacology* **689** 255–261.
- Fu Y, Liu B, Zhang N, Liu Z, Liang D, Li F, Cao Y, Feng X, Zhang X y Yang Z** (2013) Magnolol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by interfering with TLR4 mediated NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology* **145** 193–199.
- Gao Y, Chu S, Li J, Li J, Zhang Z, Xia C, Heng Y, Zhang M, Hu J, Wei G et al.** (2015a) Anti-inflammatory function of ginsenoside Rg1 on alcoholic hepatitis through glucocorticoid receptor related nuclear factor-kappa B pathway. *Journal of Ethnopharmacology* **173** 231–240.

- Gao X jiao, Guo M yao, Zhang Z cai, Wang T cheng, Cao Y guo y Zhang N sheng** (2015b) Bergein Plays an Anti-Inflammatory Role via the Modulation of MAPK and NF- κ B Signaling Pathways in a Mouse Model of LPS-Induced Mastitis. *Inflammation* **38** 1142–1150.
- Gao Y, Li J, Wang J, Li X, Li J, Chu S, Li L, Chen N y Zhang L** (2020) Ginsenoside Rg1 prevent and treat inflammatory diseases: A review. *International Immunopharmacology* **87**.
- García A y De Sanctis JB** (2014) An overview of adjuvant formulations and delivery systems. *Apmis* **122** 257–267.
- Ghosh S y Karin M** (2002) Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* **109**.
- Gomes F y Henriques M** (2016) Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology* **72** 377–382.
- Gómez MI, Sordelli DO, Buzzola FR y García VE** (2002) Induction of cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. *Infection and Immunity* **70** 4254–4260.
- Gouwy M, Struyf S, Proost P y Van Damme J** (2005) Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **16** 561–580.
- Green KJ y Rowbottom DG** (2003) Exercise-induced changes to in vitro T-lymphocyte mitogen responses using CFSE. *Journal of Applied Physiology* **95** 57–63.
- Günther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H y 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 interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor n. *Infection and Immunity* **79** 695–707.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O y Hogeveen H** (2007) Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly* **29** 18–31.
- Hayden MS y Ghosh S** (2008) Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* **132** 344–362.
- He F y Yu LM** (2016) Effects of ginsenoside Rg1 on characteristics and functions of adult stem cells. *Chinese Pharmacological Bulletin* **32** 319–322.
- He F, Yu C, Liu T y Jia H** (2020) Ginsenoside Rg1 as an effective regulator of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Pharmacology* **10** 1565.
- Hébert A, Sayasith K, Senechal S, Dubreuil P y Lagace J** (2000) Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiology Letters* **193** 57–62.
- Hermann C** (2007) Variability of host-pathogen interaction. *Journal of Endotoxin Research* **13** 199–218.
- Ho LJ, Juan TY, Chao P, Wu WL, Chang DM, Chang SY y Lai JH** (2004) Plant alkaloid tetrandrine

- downregulates I κ B α kinases-I κ B α -NF- κ B signaling pathway in human peripheral blood T cell. *British Journal of Pharmacology* **143** 919–927.
- Ho NI, Huis In 't Veld LGM, Raaijmakers TK y Adema GJ** (2018) Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? *Frontiers in immunology* **9** 2874.
- Hoffmann A, Natoli G y Ghosh G** (2006) Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene* **25** 6706–6716.
- Holdsworth SR y Can PY** (2015) Cytokines: Names and numbers you should care about. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **10** 2243–2254.
- Hu S** (2002) Immunomodulatory and adjuvant effects of ginseng extracts: with emphasis on defence mechanisms of the bovine udder.
- Hu S, Concha C, Cooray R y Holmberg O** (1995) Ginseng-enhanced oxidative and phagocytic activities of polymorphonuclear leucocytes from bovine peripheral blood and stripping milk. *BioMed Central* **26** 155–161.
- Hu S, Concha C, Johannisson A, Meglia G y Waller KP** (2001) Effect of subcutaneous injection of ginseng on cows with subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* **48** 519–528.
- Hu S, Concha C, Lin F y Persson Waller K** (2003) Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **91** 29–37.
- Huang Y, Zou Y, Lin L y Zheng R** (2017) Ginsenoside Rg1 activates dendritic cells and acts as a vaccine adjuvant inducing protective cellular responses against lymphomas. *DNA and Cell Biology* **36** 1168–1177.
- Hussen J, Düvel A, Sandra O, Smith D, Sheldon IM, Zieger P y Schuberth HJ** (2013) Phenotypic and Functional Heterogeneity of Bovine Blood Monocytes. *PLoS ONE* **8** 1–11.
- Huynh HT, Robitaille G y Turner JD** (1991) Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An in vitro model for bovine lactation. *Experimental Cell Research* **197** 191–199.
- Ibeagha-Awemu EM, Lee JW, Ibeagha AE, Bannerman DD, Paape MJ y Zhao X** (2008) Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Research* **39** 1–12.
- Im DS** (2020) Pro-resolving effect of ginsenosides as an anti-inflammatory mechanism of Panax ginseng. *Biomolecules* **10** 444.
- Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H et al.** (2009) Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense

- against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity* **30** 108–119.
- Joo SS, Won TJ y Lee DI** (2005) Reciprocal activity of ginsenosides in the production of proinflammatory repertoire, and their potential roles in neuroprotection in vitro. *Planta Medica* **71** 476–481.
- Kang S y Min H** (2012) Ginseng, the “immunity boost”: The effects of panax ginseng on immune system. *Journal of Ginseng Research* **36** 354–368.
- Khaled WT, Read EKC, Nicholson SE, Baxter FO, Brennan AJ, Came PJ, Sprigg N, McKenzie ANJ y Watson CJ** (2007) The IL-4/IL-13/stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development* **134** 2739–2750.
- Kim MY y Cho JY** (2013) 20S-dihydroprotopanaxadiol, a ginsenoside derivative, boosts innate immune responses of monocytes and macrophages. *Journal of Ginseng Research* **37** 293–299.
- Kim M, Lee J, Lee K y Yang D** (2005) Microbial conversion of major ginsenoside Rb1 to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd. Phyto-pharmacology View project. *The Journal of Microbiology* **43** 456–462.
- Kim JH, Yi YS, Kim MY y Cho JY** (2017) Role of ginsenosides, the main active components of Panax ginseng, in inflammatory responses and diseases. *Journal of Ginseng Research* **41** 435–443.
- Kumar D, Arya V, Kaur R, Bhat ZA, Gupta VK y Kumar V** (2012) A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **45** 165–184.
- Lara-Zárate L, López-Meza JE y Ochoa-Zarzosa A** (2011) *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* **51** 313–318.
- Lee EJ, Ko E, Lee J, Rho S, Ko S, Shin MK, Min B Il, Hong MC, Kim SY y Bae H** (2004) Ginsenoside Rg1 enhances CD4+ T-cell activities and modulates Th1/Th2 differentiation. *International Immunopharmacology* **4** 235–244.
- Lee YG, Byeon SE, Kim JY, Lee JY, Rhee MH, Hong S, Wu JC, Lee HS, Kim MJ, Cho DH et al.** (2007) Immunomodulatory effect of Hibiscus cannabinus extract on macrophage functions. *Journal of Ethnopharmacology* **113** 62–71.
- Lee NH, Yoo SR, Kim HG, Cho JH y Son CG** (2012) Safety and tolerability of panax ginseng root extract: A randomized, placebo-controlled, clinical trial in healthy Korean volunteers. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* **18** 1061–1069.
- Leserman L** (2004) Liposomes as protein carriers in immunology. *Journal of Liposome Research* **14** 175–189.
- Li J, Yang C, Zhang S, Liu S, Zhao L, Luo H, Chen Y y Huang W** (2018a) Ginsenoside Rg1 inhibits

- inflammatory responses via modulation of the nuclear factor- κ B pathway and inhibition of inflammasome activation in alcoholic hepatitis. *International Journal of Molecular Medicine* **41** 899–907.
- Li J, Yang C, Zhang S, Liu S, Zhao L, Luo H, Chen Y y Huang W** (2018b) Ginsenoside Rg1 inhibits inflammatory responses via modulation of the nuclear factor- κ B pathway and inhibition of inflammasome activation in alcoholic hepatitis. *International Journal of Molecular Medicine* **41** 899–907.
- Lin J, Yeh KS, Liu HT y Lin JH** (2009) *Staphylococcus aureus* isolated from pork and chicken carcasses in taiwan: Prevalence and antimicrobial susceptibility. *Journal of Food Protection* **72** 608–611.
- Livak KJ y Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25** 402–408.
- McCurdy JD, Olynych TJ, Maher LH y Marshall JS** (2003) Cutting Edge: Distinct Toll-Like Receptor 2 Activators Selectively Induce Different Classes of Mediator Production from Human Mast Cells. *The Journal of Immunology* **170** 1625–1629.
- McGuire K, Jones M, Werling D, Williams JL, Glass EJ y Jann O** (2006) Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal Genetics* **37** 47–50.
- Meglia GE y Mata HT** (2017) Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. *Ciencia Veterinaria* **3** 29–40.
- Mémet S** (2006) NF- κ B functions in the nervous system: From development to disease. *Biochemical Pharmacology* **72** 1180–1195.
- Middleton JR** (2008) *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Review of Vaccines* **7** 805–815.
- Middleton JR, Luby CD y Adams DS** (2009) Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Veterinary Microbiology* **134** 192–198.
- Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML et al.** (2008) Impaired TH17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* **452** 773–776.
- Mohan P, Subramaniyam S, Mathiyalagan R y Yang DC** (2018) Molecular signaling of ginsenosides Rb1, Rg1, and Rg3 and their mode of actions. *Journal of Ginseng Research* **42** 123–132.
- Monks J, Rosner D, Geske FJ, Lehman L, Hanson L, Neville MC y Fadok VA** (2005) Epithelial cells as phagocytes: Apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death and Differentiation* **12** 107–114.
- Monks J, Smith-Steinhart C, Kruk ER, Fadok VA y Henson PM** (2008) Epithelial cells remove

- apoptotic epithelial cells during post-lactation involution of the mouse mammary gland. *Biology of Reproduction* **78** 586–594.
- Montforts M** (2005) Validation of the EU Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicines | Request PDF. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Leiden University, Netherlands.
- Moser M y Leo O** (2010) Key concepts in immunology. *Vaccine* **28** 2–13.
- Murphy AG, O’Keefe KM, Lalor SJ, Maher BM, Mills KHG y McLoughlin RM** (2014) *Staphylococcus aureus* Infection of Mice Expands a Population of Memory $\gamma\delta$ T Cells That Are Protective against Subsequent Infection. *The Journal of Immunology* **192** 3697–3708.
- Musilova J, Mulcahy ME, Kuijk MM, McLoughlin RM y Bowie AG** (2019) Toll-like receptor 2–dependent endosomal signaling by *Staphylococcus aureus* in monocytes induces type I interferon and promotes intracellular survival. *Journal of Biological Chemistry* **294** 17031–17042.
- Nakaya TA, Kita M, Kuriyama H, Iwakura Y y Imanishi J** (2004) Panax ginseng induces production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **24** 93–100.
- Ning C, Gao X, Wang C, Huo X y Liu Z** (2018) Protective effects of ginsenoside Rg1 against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice through inhibiting toll-like receptor 4 signaling pathway. *International Immunopharmacology* **61** 266–276.
- O’Hagan DT** (2015) New-generation vaccine adjuvants. *ELS* 1–7.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC y Strauss JF** (2001) The extra domain A of fibronectin activates toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* **276** 10229–10233.
- Oliver S y Mitchell B** (1983) Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *Journal of Dairy Sci.*
- Oliver SP y Sordillo LM** (1988) Udder health in the periparturient period. *Journal of Dairy Science* **71** 2584–2606.
- Oliver SP y Sordillo LM** (1989) Approaches to the manipulation of mammary involution. *Journal of Dairy Science* **72** 1647–1664.
- Oliver SP, Lewis M, Gillespie B, Dowlen H, Jaenicke E y Roberts R** (2004) Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality.*
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A y Baizabal-Aguirre VM** (2007) Innate immune response of bovine mammary gland

- to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection* **54** 399–409.
- Pannacci M, Lucini V, Colleoni F, Martucci C, Grosso S, Sacerdote P y 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, Behavior, and Immunity* **20** 546–551.
- Park H-Y, Lee S-H, Lee K-S, Yoon H-K, Yoo Y-C, Lee J, Choi JE, Kim P-H y Park S-R** (2015) Ginsenoside Rg1 and 20(S)-Rg3 induce IgA production by mouse B cells. *Immune Network* **15** 331.
- Parra FL, Morilla MJ y Romero EL** (2020) Toll like receptors agonists-based nanomedicines as veterinary immunotherapies. *Precision Nanomedicine* **3** 577–607.
- Pereyra EAL, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, Calvinho LF, Diez C y Dallard BE** (2016) Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology* **183** 69–77.
- Petzl W, Zerbe H, Günther J, Seyfert HM, Hussen J y Schuberth HJ** (2018) Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Research in Veterinary Science* **116** 55–61.
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**.
- Pollitt EIG, Szkuta PT, Burns N y Foster SJ** (2018) *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS Pathogens* **14** 1–27.
- Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I y Costa L** (2010) Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced ma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **134** 208–217.
- Qu DF, Yu HJ, Liu Z, Zhang DF, Zhou QJ, Zhang HL y Du AF** (2011) Ginsenoside Rg1 enhances immune response induced by recombinant *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen. *Veterinary Parasitology* **179** 28–34.
- Quah BJC y Parish CR** (2012) New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *Journal of Immunological Methods* **379** 1–14.
- Quinn PJ** (1990) Mechanisms of Action of Some Immunomodulators Used in Veterinary Medicine. En *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, pp 43–99. Academic Press.

- Rainard P** (2005) Tackling mastitis in dairy cows. *Nature Biotechnology* **23** 430–432.
- Rainard P y Riollet C** (2006) Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research* **37** 369–400.
- Rainard P, Foucras G, Fitzgerald JR, Watts JL, Koop G y Middleton JR** (2018) Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases* **65** 149–165.
- Reidel I, Giorello A, Calvino LF y Gennaro AM** (2017) Effects of the liposomal co-encapsulation of antigen and PO-CpG oligonucleotide on immune response in mice.
- den Reijer PM, Lemmens-den Toom N, Kant S, Snijders S V., Boelens H, Tavakol M, Verkaik NJ, van Belkum A, Verbrugh HA y van Wamel WJB** (2013) Characterization of the Humoral Immune Response during *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Global Gene Expression by *Staphylococcus aureus* in Human Blood. *PLoS ONE* **8** e53391.
- Renna MS, Pereyra EAL, Baravalle C, Camussone CM, Dallard BE, Marcipar IS y Calvino LF** (2014) Functional role of antibodies generated in heifers through immunization with *Staphylococcus aureus* vaccines in invasion and phagocytosis assays. *FEMS Microbiology Letters* **360** 62–69.
- Reyher KK, Dufour S, Barkema HW, Des Côteaux L, DeVries TJ, Dohoo IR, Keefe GP, Roy JP y Scholl DT** (2011) The National Cohort of Dairy Farms-A data collection platform for mastitis research in Canada. *Journal of Dairy Science* **94** 1616–1626.
- Rhule A, Navarro S, Smith JR y Shepherd DM** (2006) Panax notoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology* **106** 121–128.
- Riollet C, Rainard P, Science BP-J of dairy y 2001 U** (2001) Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci* **84** 1077–1084.
- Ruegg PL** (2017) A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science* **100** 10381–10397.
- Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK y Whyte MKB** (2003) Selective roles for toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *The Journal of Immunology* **170** 5268–5275.
- Sacco SC, Velázquez NS, Renna MS, Beccaria C, Baravalle C, Pereyra EAL, Monecke S, Calvino LF y Dallard BE** (2020) Capacity of two *Staphylococcus aureus* strains with different adaptation genotypes to persist and induce damage in bovine mammary epithelial cells and to activate macrophages. *Microbial Pathogenesis* **142** 104017.
- Sarikaya H, Schlamberger G, Meyer HHD y Bruckmaier RM** (2006) Leukocyte populations and

- mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **89** 2479–2486.
- Scali F, Camussone C, Calvino LF, Cipolla M y Zecconi A** (2015) Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? *Research in Veterinary Science* **100** 88–99.
- Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A et al.** (2011) Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **144** 270–289.
- Sendi P y Proctor RA** (2009) *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends in Microbiology* **17** 54–58.
- Signorini M, Canavesio V, Neder V, InVet AM- y 2008 U** (2008a) 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 In Vet* **8** 91–102.
- Signorini M, Sequeira G, Bonazza J, Dalla Santina R, Martí L, Frizzo L y Rosmini M** (2008b) Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *Revista Científica, FCV-LUZ XVIII* 207–217.
- Silvestrini P, Beccaria C, Pereyra EAL, Renna MS, Ortega HH, Calvino LF, Dallard BE y Baravalle C** (2017) Intramammary inoculation of *Panax ginseng* plays an immunoprotective role in *Staphylococcus aureus* infection in a murine model. *Research in Veterinary Science* **115** 211–220.
- Sinha B y Fraunholz M** (2010) *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *International Journal of Medical Microbiology* **300** 170–175.
- Sjölander A, Drane D, Maraskovsky E, Scheerlinck JP, Suhrbier A, Tennent J y Pearse M** (2001) Immune responses to ISCOM® formulations in animal and primate models. En *Vaccine*, pp 2661–2665.
- Smiley ST, King JA y Hancock WW** (2001) Fibrinogen Stimulates Macrophage Chemokine Secretion Through Toll-Like Receptor 4. *The Journal of Immunology* **167** 2887–2894.
- Song X, Bao S, Wu L y Hu S** (2009) Ginseng stem-leaf saponins (GSLs) and mineral oil act synergistically to enhance the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice. *Vaccine* **27** 51–55.
- Sordillo LM** (2018) Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **34** 507–523.
- Sordillo LM y Babiuk LA** (1991) Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following in vitro exposure to recombinant bovine interferon gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **27** 393–402.

- Sordillo L y Nickerson S** (1988) Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am J Vet Res* **49** 1112–1120.
- Sordillo LM y Streicher KL** (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **7** 135–146.
- Sørensen JT y Enevoldsen C** (1991) Effect of Dry Period Length on Milk Production in Subsequent Lactation. *Journal of Dairy Science* **74** 1277–1283.
- Su F, Yuan L, Zhang L y 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 y Hu S** (2015) Protective effect of ginsenosides Rg1 and Re on lipopolysaccharide-induced sepsis by competitive binding to toll-like receptor 4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59** 5654–5663.
- Suliman A, Kwaga J, Umoh V y Okolocha E** (2012) Macro-restriction analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Nigeria. *Afr J Microbiol Res* **6** 6270–6274.
- Sun J, Hu S y 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 J, Song X y Hu S** (2008) Ginsenoside Rg1 and aluminum hydroxide synergistically promote immune responses to ovalbumin in BALB/c mice. *Clinical and Vaccine Immunology* **15** 303–307.
- Sun HX, Xie Y y Ye YP** (2009a) Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* **27** 1787–1796.
- Sun HX, Xie Y y Ye YP** (2009b) ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine* **27** 4388–4401.
- Sun XC, Ren XF, Chen L, Gao XQ, Xie JX y Chen WF** (2016) Glucocorticoid receptor is involved in the neuroprotective effect of ginsenoside Rg1 against inflammation-induced dopaminergic neuronal degeneration in substantia nigra. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **155** 94–103.
- Takahashi H, Komatsu T, Hodate K, Horino R y Yokomizo Y** (2005) Effect of intramammary injection of rIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and *S. aureus* in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **52** 32–37.
- Takeda K y Akira S** (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* **17** 1–14.
- Tan B y Vanitha J** (2012) Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Some Traditional Chinese Medicinal Herbs: A Review. *Current Medicinal Chemistry* **11** 1423–1430.

- Tao T, Chen F, Bo L, Xie Q, Yi W, Zou Y, Hu B, Li J y Deng X** (2014) Ginsenoside Rg1 protects mouse liver against ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory and anti-apoptosis properties. *Journal of Surgical Research* **191** 231–238.
- Temming AR, Bentlage AEH, de Taeye SW, Bosman GP, Lissenberg-Thunnissen SN, Derksen NIL, Brassier G, Mok JY, van Esch WJE, Howie HL *et al.*** (2020) Cross-reactivity of mouse IgG subclasses to human Fc gamma receptors: Antibody deglycosylation only eliminates IgG2b binding. *Molecular Immunology* **127** 79–86.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C y Simon JC** (2002) Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine* **195** 99–111.
- Thomas DC** (2017) The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunology Letters* **192** 88–96.
- Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F y Mallard BA** (2014) Bovine mastitis: Frontiers in immunogenetics. *Frontiers in Immunology* **5** 1–10.
- Tzianabos AO** (2000) Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. *Clinical Microbiology Reviews* **13** 523–533.
- Wang Y, Liu Y, Zhang XY, Xu LH, Ouyang DY, Liu KP, Pan H, He J y He XH** (2014) Ginsenoside Rg1 regulates innate immune responses in macrophages through differentially modulating the NF- κ B and PI3K/Akt/mTOR pathways. *International Immunopharmacology* **23** 77–84.
- Wang YM, Ma YQ, Bi SC, Ma XD, Guan R, Wang SH, Lu MQ, Shi FS y Hu SH** (2019) Therapeutic effect of ginsenoside Rg1 on mastitis experimentally induced by lipopolysaccharide in lactating goats. *Journal of Dairy Science* **102** 2443–2452.
- Watson CJ** (2009) Immune cell regulators in mouse mammary development and involution. *Journal of animal science* **87** 35–42.
- Wei Z, Fu Y, Zhou E, Tian Y, Yao M, Li Y, Yang Z y Cao Y** (2014a) Effects of niacin on *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by modulating NF- κ B activation. *Microbial Pathogenesis* **71–72** 62–67.
- Wei Z, Zhou E, Guo C, Fu Y, Yu Y, Li Y, Yao M, Zhang N y Yang Z** (2014b) Thymol inhibits *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF- κ B activation. *Microbial Pathogenesis* **71–72** 15–19.
- Wellnitz O y Bruckmaier RM** (2012) The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal* **192** 148–152.
- Werling D, Piercy J y Coffey TJ** (2006) Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-Potential role in pathogen discrimination? *Veterinary Immunology and Immunopathology* **112** 2–11.

- Werling D, Hope JC, Siddiqui N, Widdison S, Russell C, Sopp P y Coffey TJ (2017) Subset-specific expression of toll-like receptors by bovine afferent lymph dendritic cells. *Frontiers in Veterinary Science* **4** 1–6.
- Wu H, Zhao G, Jiang K, Chen X, Zhu Z, Qiu C y Deng G (2016) Puerarin Exerts an Antiinflammatory Effect by Inhibiting NF- κ B and MAPK Activation in *Staphylococcus aureus*-Induced Mastitis. *Phytotherapy research : PTR* **30** 1658–1664.
- Xin C, Kim J, Quan H, Yin M, Jeong S, Choi J II, Jang EA, Lee CH, Kim DH y Bae HB (2019a) Ginsenoside Rg3 promotes Fc gamma receptor-mediated phagocytosis of bacteria by macrophages via an extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *International Immunopharmacology* **77** 105945.
- Xin C, Quan H, Kim JM, Hur YH, Shin JY, Bae HB y Choi J II (2019b) Ginsenoside Rb1 increases macrophage phagocytosis through p38 mitogen-activated protein kinase/Akt pathway. *Journal of Ginseng Research* **43** 394–401.
- Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Günther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ y Seyfert HM (2008) Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology* **45** 1385–1397.
- Yang WS, Yi YS, Kim D, Kim MH, Park JG, Kim E, Lee SY, Yoon K, Kim JH, Park J *et al.* (2017) Nuclear factor kappa-B- and activator protein-1-mediated immunostimulatory activity of compound K in monocytes and macrophages. *Journal of Ginseng Research* **41** 298–306.
- Yu H, Zhen J, Yang Y, Gu J, Wu S y Liu Q (2016) Ginsenoside Rg1 ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in a streptozotocin-induced diabetes rat model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **20** 623–631.
- Yuan L, Wu L, Chen J, Wu Q y Hu S (2010) Paclitaxel acts as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. *Vaccine* **28** 4402–4410.
- Yuan D, Yuan Q, Cui Q, Liu C, Zhou Z, Zhao H, Dun Y, Wang T y Zhang C (2016a) Vaccine adjuvant ginsenoside Rg1 enhances immune responses against hepatitis B surface antigen in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **94** 676–681.
- Yuan D, Yuan Q, Cui Q, Liu C, Zhou Z, Zhao H, Dun Y, Wang T y Zhang C (2016b) Vaccine adjuvant ginsenoside Rg1 enhances immune responses against hepatitis B surface antigen in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **94** 676–681.
- Zecconi A, Calvinho L y Fox K (2006) *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin* **408** 1–36.

- Zhao X y Lacasse P** (2008) Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of animal science* **86** 57–65.
- Zhao BS, Liu Y, Gao XY, Zhai HQ, Guo JY y 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* **19** 16925–16936.
- Zhao Y, Zhou M, Gao Y, Liu H, Yang W, Yue J y Chen D** (2015) Shifted T helper cell polarization in a murine *Staphylococcus aureus* mastitis model. *PLoS ONE* **10** 1–15.
- Zou Y, Tao T, Tian Y, Zhu J, Cao L, Deng X y Li J** (2013) Ginsenoside Rg1 improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis by suppressing the inflammatory response and apoptosis of lymphocytes. *Journal of Surgical Research* **183** 760–766.



8. ANEXOS

Anexo I

I. Anticuerpos utilizados en ensayos de CF y ELISA.

A continuación se detallan los anticuerpos empleados en los ensayos de CF y ELISA indirecto junto a las características y diluciones utilizadas (Tabla 2).

Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados en los diferentes ensayos y técnicas.

| <i>Anticuerpos</i> | <i>Clon</i> | <i>Dilución de uso</i> | <i>Uso</i> | <i>Catálogo</i> | <i>Marca</i> |
|--------------------------------|-------------|------------------------|------------|-----------------|---------------|
| <i>anti-bovine</i> TLR2-A467 | AbD12542 | 1/25* | CF | HCA151A647 | Bio-Rad |
| <i>anti-human</i> TLR4-A488 | HTA125 | 1/10* | CF | MCA2061A488 | Bio-Rad |
| <i>anti-human</i> CD14-APC | M5E2 | 1/200* | CF | 301808 | BioLegend |
| <i>anti-bovine</i> MHC-II-FITC | IL-A21 | 1/100* | CF | MCA2445GA | Bio-Rad |
| <i>anti-bovine</i> CD80-PE | IL-A159 | 1/50* | CF | MCA2436GA | Bio-Rad |
| <i>anti-mouse</i> IgG-HRP | - | 1/10000 [†] | ELISA | A9044 | Sigma-Aldrich |
| <i>anti-mouse</i> IgG-HRP | - | 1/5000 [†] | ELISA | 62-6520 | Invitrogen |
| <i>anti-mouse</i> IgG2a-HRP | - | 1/2500 [†] | ELISA | A-10685 | Invitrogen |

Referencias: A467: Alexa Fluor 467; A488: Alexa Fluor 488; APC: allofocianina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; HRP: peroxidasa; CF: citometría de flujo; ELISA: inmunoensayo enzimático. *Dilución en volumen final de 25 µl. [†]Dilución en volumen final de 100 µl.

Anexo II

II.1. Ensayo 1: ensayo preliminar para determinar la concentración de Rg1 a inocular en ratones.

II.1.1. Registro de pesos.

El peso de cada animal se registró previo a cada inoculación y al momento del sacrificio. En la mayoría de los casos, el peso de los animales de todos los grupos aumentó progresivamente a lo largo de todo el ensayo, conforme a lo esperado para la especie (Figura 23).

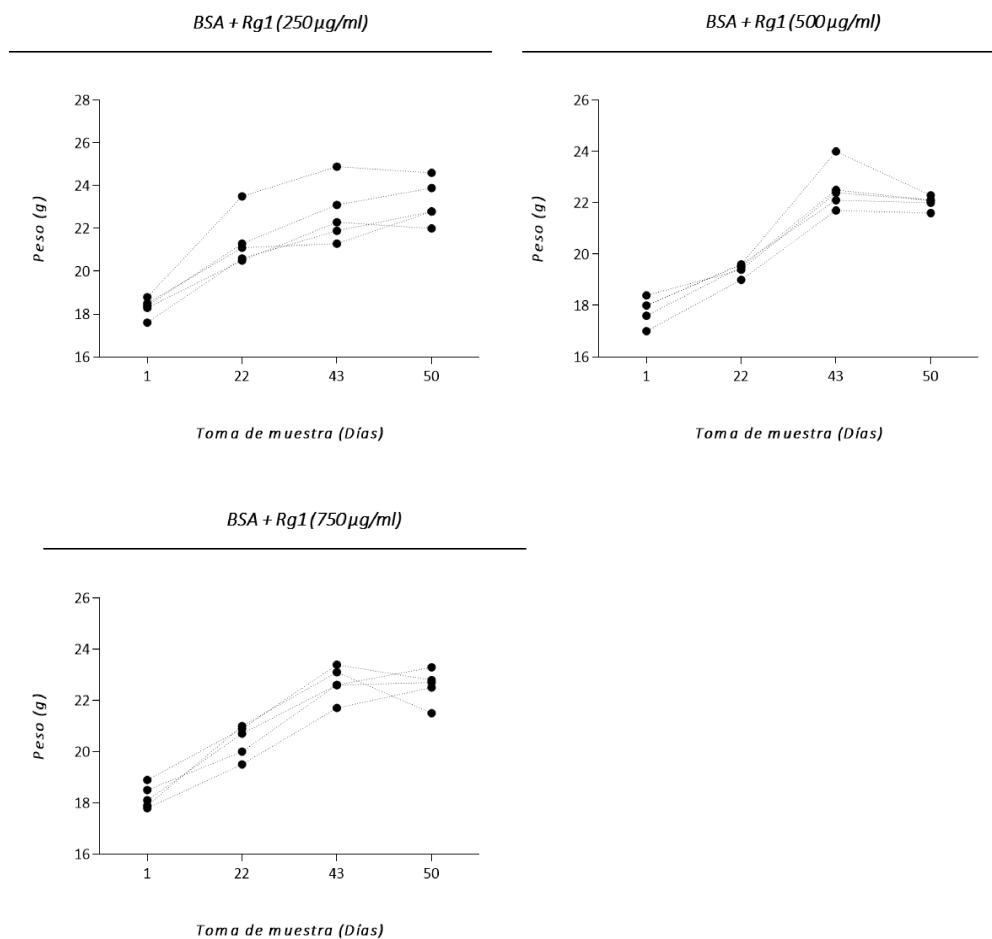


Figura 23. Peso (g) de los animales de cada grupo experimental en función a los días de toma de muestra (ensayo 1). Se graficó el peso de los animales de cada grupo previo a cada inoculación.

II.2. Ensayo 2: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando BSA como antígeno.

II.2.1. Registro de pesos.

En la mayoría de los casos, el peso de los animales de todos los grupos aumentó progresivamente a lo largo de todo el ensayo, conforme a lo esperado para la especie (Figura 24).

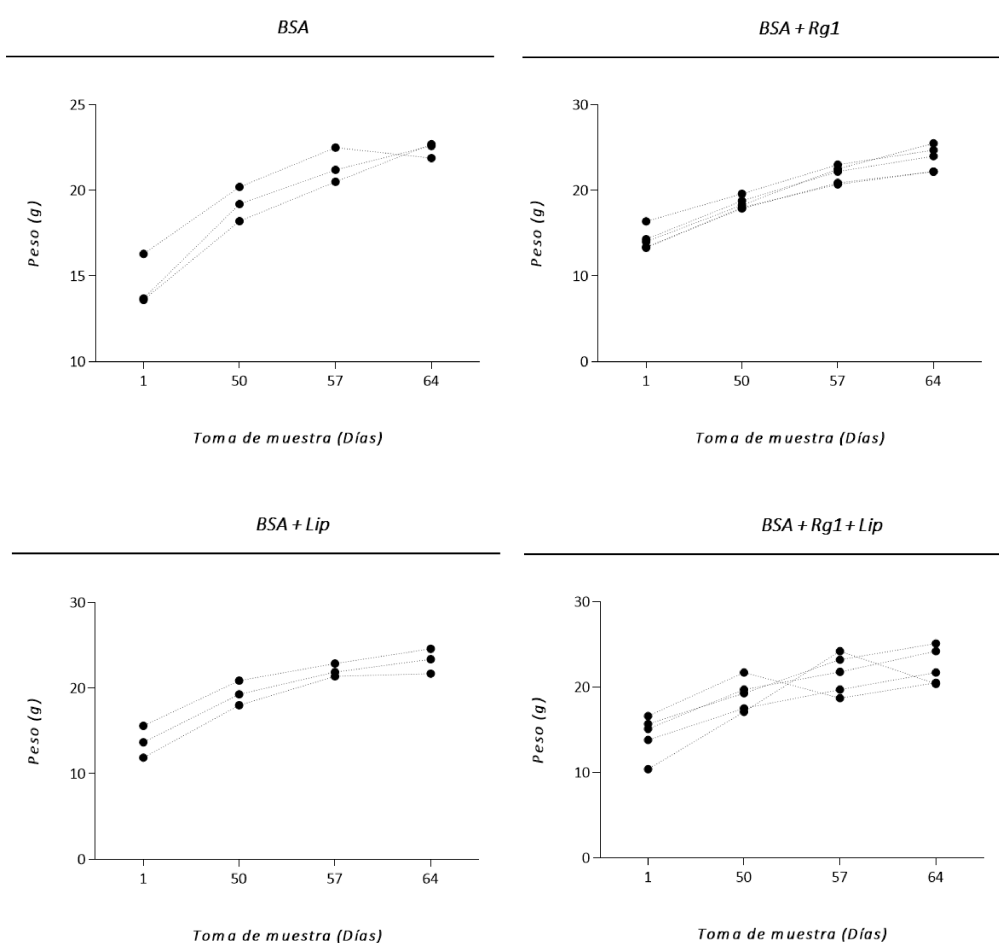


Figura 24. Peso (g) de los animales de cada grupo experimental en función a los días de toma de muestra (ensayo 2). Se graficó el peso de los animales de cada grupo previo a cada inoculación.

II.2.2. Hemogramas.

Los principales parámetros hematológicos evaluados (glóbulos rojos, plaquetas, granulocitos, linfocitos y monocitos) en las muestras de sangre el día del sacrificio de los animales de los diferentes grupos experimentales se detallan a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros hematológicos evaluados en muestras de sangre en los diferentes grupos experimentales, luego del sacrificio de los animales (ensayo 2).

| Parámetros hematológicos | ① | ② | ③ |
|--|---------------------|---------------------|--------------------|
| | BSA | BSA + Rg1 | BSA + Lip |
| Glóbulos rojos ($\times 10^6$ cél/mm ³) | 6,92 \pm 0,79 | 7,70 \pm 0,40 | 7,43 \pm 0,10 |
| Plaquetas ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 320,33 \pm 335,96 | 585,40 \pm 291,76 | 660,00 \pm 31,11 |
| Glóbulos blancos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 2,97 \pm 0,61 | 8,22 \pm 12,35 | 3,85 \pm 1,91 |
| Granulocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 0,54 \pm 0,08 | 1,64 \pm 2,43 | 0,89 \pm 0,17 |
| Linfocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 2,37 \pm 0,70 | 6,44 \pm 9,73 | 2,87 \pm 0,35 |
| Monocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 0,06 \pm 0,02 | 0,14 \pm 0,19 | 0,10 \pm 0,04 |

| Parámetros hematológicos | ④ |
|--|--------------------|
| | BSA + Rg1+ Lip |
| Glóbulos rojos ($\times 10^6$ cél/mm ³) | 7,78 \pm 0,11 |
| Plaquetas ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 681,00 \pm 92,65 |
| Glóbulos blancos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 3,64 \pm 1,07 |
| Granulocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 0,79 \pm 0,23 |
| Linfocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 3,12 \pm 0,89 |
| Monocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 0,06 \pm 0,01 |

II.3. Ensayo 3: ensayo preliminar de inmunización en ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) y empleando un lisado de *S. aureus* como antígeno.

II.3.1. Registro de pesos.

En general, el peso de los animales de todos los grupos experimentales aumentó progresivamente a lo largo de todo el ensayo, conforme a lo esperado para la especie (Figura 25).

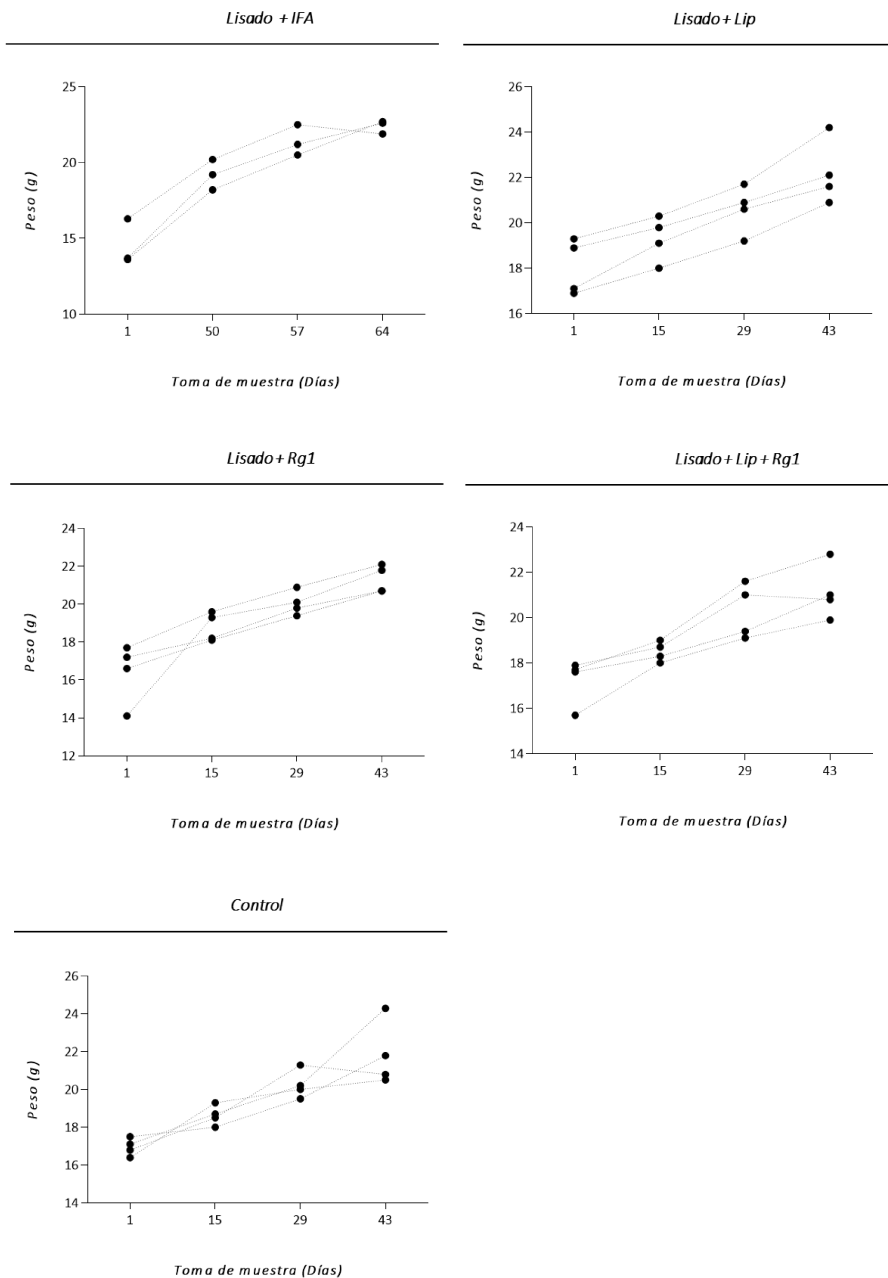


Figura 25. Peso (g) de los animales de cada grupo experimental en función a los días de toma de muestra (ensayo 3). Se graficó el peso de los animales de cada grupo previo a cada inoculación.

II.3.2. Controles positivos empleados en la evaluación de la respuesta celular.

II.3.2.1. Ensayos de proliferación mediante MTT.

El IP obtenido en células de bazo estimuladas con anti-CD3 (2,5 µg/ml), empleado como control positivo de proliferación, fue mayor respecto a las células basales y células estimuladas

con 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisado de *S. aureus* en todos los grupos experimentales evaluados (Figura 26).

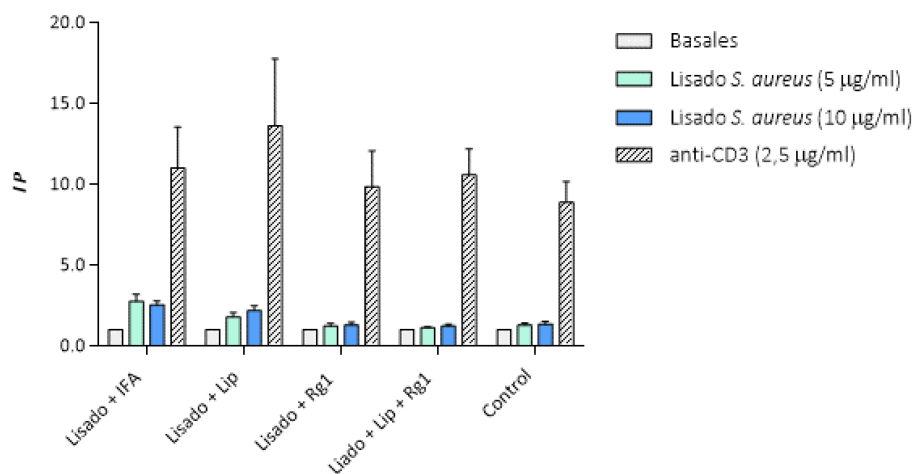


Figura 26. Índice de proliferación en células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con lisado de *S. aureus* (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-CD3 (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y basales. Los resultados fueron expresados como la media del IP de los diferentes grupos experimentales \pm EEM.

II.3.2.2. Cuantificación de citoquinas mediante ELISA indirecto.

La producción de IFN γ en células de bazo estimuladas con anti-CD3 (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fue mayor respecto a las células basales y células estimuladas con 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisado de *S. aureus* en todos los grupos experimentales evaluados (Figura 27).

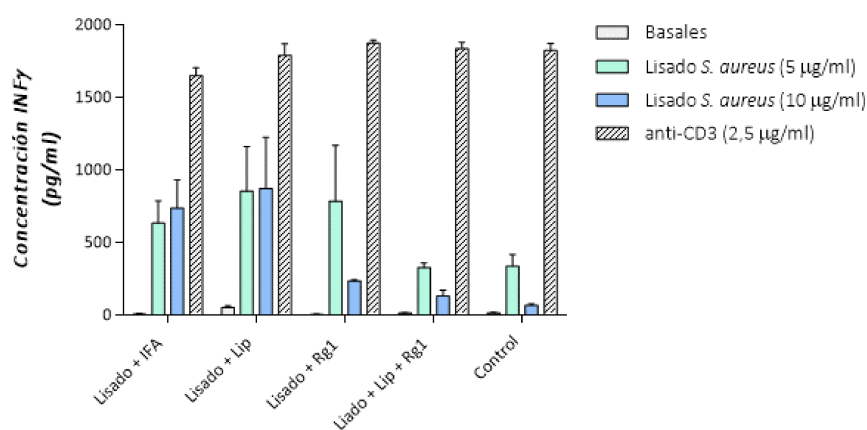


Figura 27. Producción de IFN γ en sobrenadante de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con lisado de *S. aureus* (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-CD3 (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y basales. Los resultados fueron expresados como la media la concentración de IFN γ de los diferentes grupos experimentales \pm EEM.

La producción de IL-4 en células de bazo estimuladas con anti-CD3 (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fue mayor respecto a las células basales en todos los grupos experimentales evaluados (Figura 28).

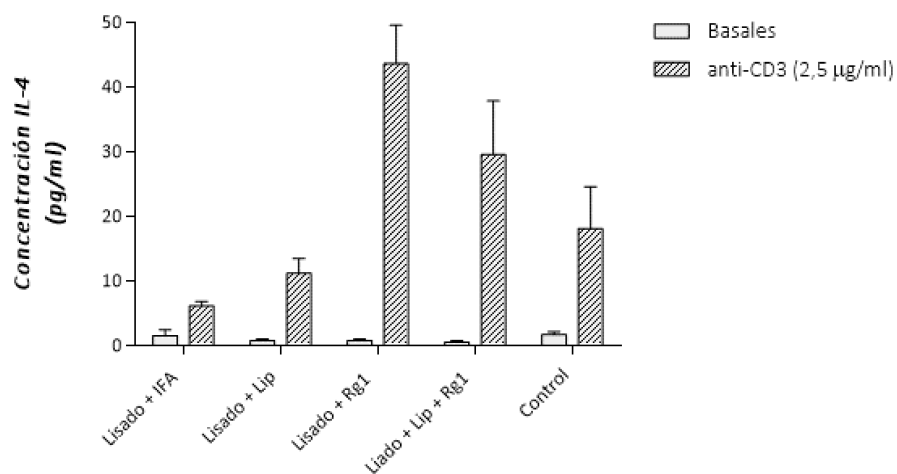


Figura 28. Producción de IL-4 en sobrenadante de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con anti-CD3 (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y basales. Los resultados fueron expresados como la media la concentración de IL-4 de los diferentes grupos experimentales \pm EEM.

II.4. Ensayo 4: inmunización de ratones con diferentes formulaciones adyuvantes (Rg1 y/o liposomas) empleando un lisado de *S. aureus* como antígeno.

II.4.1. Registro de pesos.

El peso de los animales de todos los grupos aumentó progresivamente a lo largo de todo el ensayo (Figura 29).

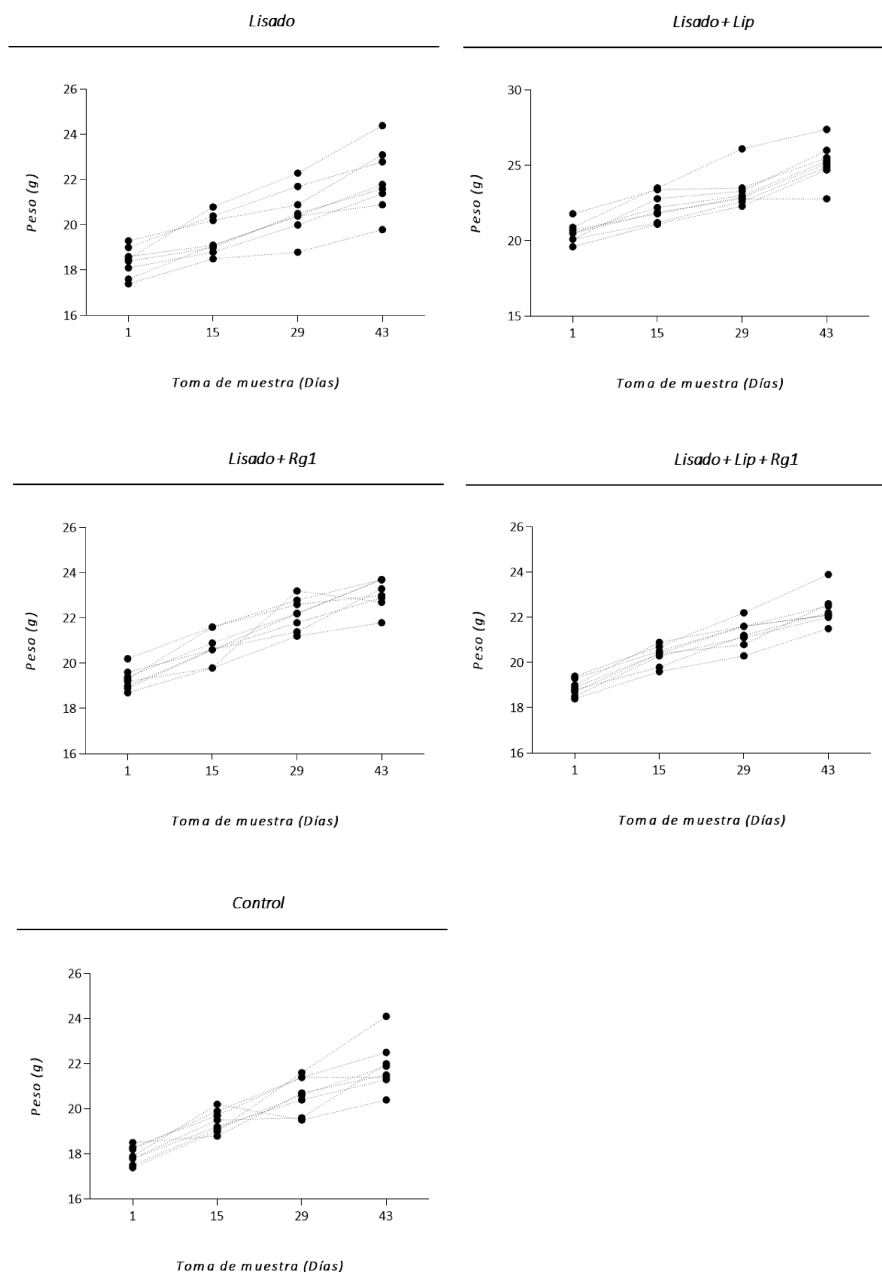


Figura 29. Peso (g) de los animales de cada grupo experimental en función a los días de toma de muestra (ensayo 4). Se graficó el peso de los animales de cada grupo previo a cada inoculación.

II.4.2. Hemogramas.

Las medias de los principales parámetros hematológicos evaluados (glóbulos rojos, plaquetas, granulocitos, linfocitos y monocitos) el día del sacrificio de los animales de los diferentes grupos experimentales se detallan a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros hematológicos evaluados en muestras de sangre en los diferentes grupos experimentales, luego del sacrificio de los animales (ensayo 4).

| Parámetros hematológicos | ① | ② | ③ |
|--|---------------------|--------------------|--------------------|
| | Lisado | Lisado + Lip | Lisado + Rg1 |
| Glóbulos rojos ($\times 10^6$ cél/mm ³) | 7,71 \pm 0,52 | 8,10 \pm 0,35 | 8,54 \pm 0,98 |
| Plaquetas ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 614,50 \pm 110,31 | 728,38 \pm 40,22 | 681,00 \pm 56,12 |
| Glóbulos blancos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 6,76 \pm 1,55 | 5,60 \pm 1,44 | 6,08 \pm 1,08 |
| Granulocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 1,38 \pm 0,36 | 1,18 \pm 0,31 | 1,17 \pm 0,32 |
| Linfocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 5,24 \pm 1,21 | 4,29 \pm 1,15 | 4,76 \pm 0,86 |
| Monocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 0,14 \pm 0,04 | 0,13 \pm 0,03 | 0,14 \pm 0,04 |

| Parámetros hematológicos | ④ | ⑤ |
|--|---------------------|---------------------|
| | Lisado + Lip + Rg1 | Control |
| Glóbulos rojos ($\times 10^6$ cél/mm ³) | 7,94 \pm 0,35 | 7,67 \pm 0,66 |
| Plaquetas ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 779,25 \pm 159,02 | 578,88 \pm 129,42 |
| Glóbulos blancos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 6,76 \pm 1,26 | 5,53 \pm 1,91 |
| Granulocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 1,43 \pm 0,34 | 1,05 \pm 0,50 |
| Linfocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 5,20 \pm 0,91 | 4,38 \pm 1,42 |
| Monocitos ($\times 10^3$ cél/mm ³) | 0,13 \pm 0,04 | 0,10 \pm 0,03 |

II.4.3. Controles positivos empleados en los ensayos de proliferación celular mediante CFSE.

Las células de bazo estimuladas con Con A (5 μ g/ml), empleada como control positivo de proliferación, mostraron una mayor proliferación celular respecto a las células basales y células estimuladas con 10 μ g/ml de lisado de *S. aureus* en todos los grupos experimentales evaluados (Figura 30).

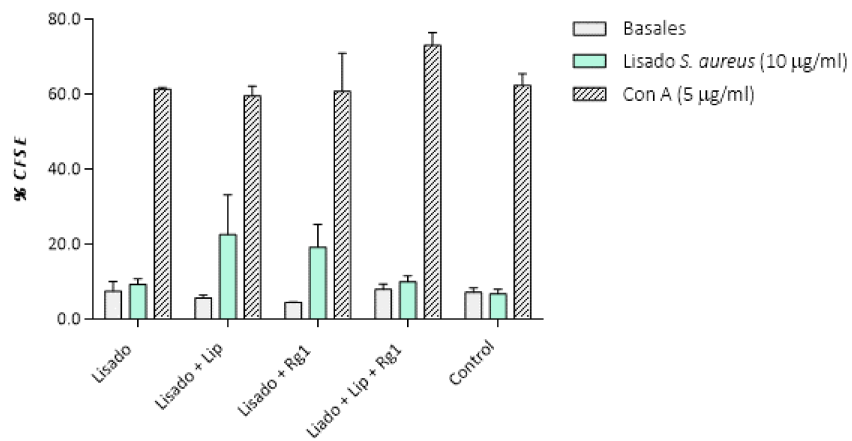


Figura 30. Proliferación de células de bazo provenientes de animales inmunizados y re-estimulados con lisado de *S. aureus* (10 µg/ml), Con A (5 µg/ml) y basales. Los resultados fueron expresados como la media del IP de los diferentes grupos experimentales ± EEM.