



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de
Doctora en Ciencias Biológicas

“ESTUDIO DEL POTENCIAL INMUNOMODULADOR DE SUSTANCIAS ACTIVAS
OBTENIDAS DE *Minthostachys verticillata* (GRISEB.) EPLING, COMO
ESTRATEGIA EN LA PREVENCIÓN DE LA MASTITIS BOVINA”

Mic. Ivana Dalila Montironi

Directora: Dra. Elina Beatriz Reinoso

Co-directora: Dra. Laura Noelia Cariddi

Río Cuarto, 16 de agosto de 2019

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas, fue realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Doctorando

Mic. Ivana Dalila MONTIRONI

Firma:

Comision de Tesis y Jurado

Dra. Viviana Alicia RIVAROLA

Firma:

Dra. Silvia Graciela CORREA

Firma:

Dra. Gabriela Egly FERESIN

Firma:

Director de Tesis

Dra. Elina Beatríz REINOSO

Firma

Co-director de Tesis

Dra. Laura Noelia CARIDDI

Firma

A mi hija Lucía
A mi compañero de vida Franco

AGRADECIMIENTOS

A Dios por sus bendiciones y por poner en mi camino a hermosas personas que me acompañaron en esta etapa de mi vida y que de alguna u otra forma me ayudaron en la elaboración de esta Tesis Doctoral y a mi crecimiento profesional y personal.

A mi dulce y amada hija Lucía que llegaste ya casi al final de esta tesis para llenarla y llenarme de cosas hermosas y hacer que todo pero todo se vuelva más fácil, aunque no lo parezca. Te amo con todas las fuerzas de mi corazón!

A mi amor, a mi compañero de vida Franco, gracias por la hermosa familia que formamos y por acompañarme durante todo este camino que entre otras cosas incluía las idas a la uni durante interminables fines de semana para controlar mis ratonas y mis cambios de humor cuando todo parecía desmoronarse. Por escucharme, aconsejarme y ser incondicional para que yo pueda terminar mi Tesis Doctoral. A vos también Te amo con todas las fuerzas de mi corazón!

A mis papas, por darme la vida, por apoyarme en todo y creer en mí, por llenarme de valores, y tanto amor incondicional. Por cuidar con tanto amor a Lucía y por ayudarme cada vez que yo tenía algún ensayo o curso. Los amo!!

A mi hermana Tati, gracias por ser mi amiga y por darme el mejor regalo que una hermana pueda dar, mi amado ahijado Batista. Los amo!

A mi Nona Clenda, un ejemplo de mujer y de lucha, gracias por rezar por nosotras y por ser tan amorosa conmigo y con Lucía. Te adoramos nonita linda!!

A Nora y Carlos, por cuidar con tanto amor a Lucía cada vez que yo tenía algún ensayo o curso, por todo el cariño y por dejarme ser parte de su familia.

A Rodolfo y Chiquina, por ser tan cariñosos conmigo y por tan amorosos con Lucía.

A Cris, mi primer amiga de Micro, ya con eso digo todo, fuiste y seguís siendo tan incondicional, gracias por acompañarme durante tantas etapas de mi vida. Te adoro amiga!

A Cyn, por acompañarme durante tantas etapas de mi vida, por tu amistad incondicional, por darme el título de tía postiza para tus mellis y fundamentalmente por cuidar a Lucía como si fuera tu bebé para que yo pudiera terminar mi tesis. Los adoro amiga!

A Iva y Leo, mis amigas de Huanchilla, que a pesar de la distancia física siempre están presentes contagiándome con su hermosa locura, las quiero mucho.

A la Dra. Elina Reinoso, mi directora de tesis, por darme la posibilidad de llevar a cabo esta tesis brindándome un lugar en su oficina y en el laboratorio de Genética Microbiana, por todos los conocimientos y confianza brindada para poder trabajar, por todos sus consejos y siempre ofrecer su ayuda desinteresada para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Noelia Cariddi, mi Co-directora de tesis, por iniciarme en el mundo de la investigación desde antes de recibirme de Microbióloga, por brindarme un espacio físico en su oficina y en el laboratorio de Inmunología, por brindarme no solo sus conocimientos, su ayuda y su dedicación durante horas, sino también por sus palabras de aliento, sus consejos y el entusiasmo puesto en el día a día del desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A las Dras. Viviana Rivarola, Gabriela Feresin y Silvia Correa, por aceptar ser miembros de la Comisión de Tesis, por la dedicación para corregir cada uno de los avances de tesis presentados, por los conocimientos y sugerencias brindadas.

A la Dra. Liliana Sabini no solo por brindarme un lugar en su oficina al inicio de mi Tesis Doctoral sino por todos los consejos y por su buena onda. Se te extraña Lili!!

A Meli y Noe, su llegada a este grupo de investigación fue hermosa, no solo porque tendría compañeras en el lab, sino también porque se volvieron mis amigas y siempre estuvieron dispuestas a ayudarme en todo, a escucharme y aconsejarme. A Anita, Flor, Lumi, Jesi, Fer, Nata, Mili y Mariana, por haber compartido todos estos años conmigo, por escucharme, por las hermosas catarsis y juntadas. Quiero agregar un Gracias por ser tan cariñosas con mi pequeña Lucía, por cuidarla y jugar con ella en cada juntada. Los quiero mucho!! Los queremos mucho tíos postizos!

Al Dr. José Raviolo, por su ayuda desinteresada, por estar siempre dispuesto a trabajar a mi lado sin importar el día, la hora o la toma de la Uni. Sin vos José no hubiese empezado ningún ensayo *in vivo*. Gracias de corazón!

A Euge Ortiz y Vale Coniglio, por brindarme con toda confianza su lugar de trabajo para que yo pudiera realizar con total libertad los ensayos *in vivo*. Voy a estar siempre agradecida chicas!

Al Dr. Guillermo Bagnis, Nelcy Schleef, Gabriela Sanchis y Analía Chanique por procesar mis ínfimas e infinitas muestras para histopatología, por su buena predisposición y el tiempo dedicado para analizarlas.

A Miguel Bueno, Leo Fantuzzi, Virginia Bergesio y Gisela Fantuzzi por su buena predisposición y su ayuda en el Bioterio.

A la Dra. Débora Decote-Ricardo, al Dr. Celio Freire-de-Lima y a todos los chicos que forman parte del hermoso grupo de investigación Brasileiro que me recibió y me abrió las puertas de su laboratorio durante tres meses, gracias por los conocimientos brindados y por hacerme sentir una brasilera más.

A las Dras. Maria Julia Pianzola y María Inés Siri y a todos los chicos que forman parte del hermoso grupo de investigación Uruguayo que me recibió y me abrió las puertas de su laboratorio durante quince días, gracias por los conocimientos brindados y por la dedicación y buena predisposición para analizar los datos obtenidos y brindarme posibles soluciones ante ciertos inconvenientes que surgieron en el ensayo de la PCR en Tiempo Real, una vez finalizada mi pasantía.

A CONICET por haberme otorgado una Beca remunerada que me dio la posibilidad de realizar esta Tesis de postgrado.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto que me brindó una educación gratuita que me permitió obtener mis dos títulos de grados y me cedió el lugar físico para realizar esta Tesis Doctoral para continuar formándome como profesional, acceder a un título de posgrado y crecer en lo personal.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xx
RECURSOS FINANCIEROS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS	xxi
INTRODUCCION	1
1.1 Mastitis bovina	1
1.1.1. Características de la enfermedad	2
1.1.2. Agentes causales de mastitis	3
1.2. Anatomía de la glándula mamaria de la vaca	5
1.2.1. Estructura externa	5
1.2.2. Estructura interna	6
1.3. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina	7
1.4. Control de las infecciones intramamarias	15
1.5. Terapias alternativas en la prevención y/o control de la mastitis	17
1.5.1. Inmunomoduladores	17
1.6. Plantas medicinales y aromáticas	18
1.7. <i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling (Lamiaceae)	20
1.7.1. Generalidades	20
1.8. Modelo murino de mastitis	23
1.9. Anatomía de la glándula mamaria del ratón	24
HIPÓTESIS	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo General	28
2.2. Objetivos específicos	28

3. MATERIALES	30
3.1. Drogas y reactivos	30
3.2. Soluciones y colorantes	31
3.3. Medios de cultivo	32
3.3.1. Medio completo DMEM (suplementado) para cultivo de células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T)	32
3.3.2. Medio completo DMEM (suplementado) para cultivo de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7	32
3.3.3. Medios de cultivo para cepas bacterianas.....	32
3.4. Material biológico	33
3.4.1. Cepas bacterianas	33
3.4.2. Células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T).....	33
3.4.3. Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7	33
3.4.4. Animales utilizados en los ensayos <i>in vivo</i>	33
3.4.5. Material vegetal	34
4. MÉTODOS.....	35
4.1. Obtención del aceite esencial de <i>M. verticillata</i>	35
4.1.1. Identificación y cuantificación de los componentes principales del aceite esencial de <i>M. verticillata</i>	36
4.2. Ensayos <i>in vitro</i>	37
4.2.1. Preparación del aceite esencial de <i>M. verticillata</i>	37
4.2.2. Ensayo de viabilidad celular en una línea de células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T)	37
4.2.3. Efecto del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> sobre la fagocitosis en una línea de macrófagos murinos (RAW 264.7)	38
4.2.3.1. Ensayo de proliferación.....	38
4.2.3.2. Evaluación de adherencia de células RAW 264.7	38
4.2.3.3. Ensayo de adherencia y fagocitosis de células RAW 264.7.....	38

4.2.3.4. Evaluación de la viabilidad de levaduras luego de la fagocitosis por las células RAW 264.7..	39
4.2.3.5. Dosaje de óxido nítrico (NO) ..	40
4.2.3.6. Dosaje de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	41
4.3. Ensayos <i>in vivo</i>	42
4.3.1. Optimización de la inoculación intramamaria en un modelo murino	42
4.3.2. Efecto de la dosis y tiempo de exposición del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras	45
4.3.2.1. Evaluación de la dosis inmunoestimulante del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> en glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras	46
4.3.3. Efecto de la dosis y tiempo de exposición de la cepa <i>E. faecium</i> EF214 mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras	46
4.3.4. Evaluación del efecto inmunomodulador del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> en un modelo murino de mastitis.....	48
4.3.5. Examinación clínica	49
4.3.6. Examinación macroscópica post-mortem.....	50
4.3.7. Examinación histopatológica.....	50
4.3.8. Recuento bacteriano a partir de homogenatos de glándula mamaria	50
4.3.9. Recuperación de bacterias de hígado, riñones y sangre	50
4.3.10. Caracterización molecular de las cepas aisladas post- inoculación.....	51
4.3.11. Extracción de ARN total de glándula mamaria murina.....	51
4.3.12. Cuantificación de la expresión de los genes <i>tlr2</i> , <i>tnf-α</i> , <i>il-1β</i> e <i>il-10</i>	52
4.3.13. Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4 ⁺ /CD69 ⁺ y CD8 ⁺ /CD69 ⁺).....	55
4.3.13.1. Marcación de antígenos de superficie de linfocitos T (CD4 ⁺ /CD69 ⁺ y CD8 ⁺ /CD69 ⁺) para su análisis por citometría de flujo..	55
4.3.14. Evaluación de anticuerpos totales (IgM, IgG e IgA) específicos para la cepa <i>E. faecium</i> EF214 en glándulas mamarias y suero.....	56
4.4. Análisis estadísticos.....	57

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
5.1. Obtención del aceite esencial de <i>M. verticillata</i>	58
5.1.1. Identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>M. verticillata</i>	58
5.2. Ensayos <i>in vitro</i>	61
5.2.1. Ensayo de viabilidad celular en células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T) mediante el método de reducción del MTT	61
5.2.2. Efecto del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> sobre la fagocitosis en una línea de macrófagos murinos (RAW 264.7)	63
5.2.2.1. Ensayo de proliferación ..	63
5.2.2.2. Evaluación de adherencia de células RAW 264.7 ..	64
5.2.2.3. Ensayo de adherencia y fagocitosis de células RAW 264.7.....	64
5.2.2.4. Evaluación de la viabilidad de levaduras luego de la fagocitosis por células RAW 264.7	68
5.2.2.5. Dosaje de óxido nítrico (NO) ..	69
5.2.2.6. Dosaje de especies reactivas del oxígeno (ROS)	71
5.3. Ensayos <i>in vivo</i>	74
5.3.1. Efecto de la dosis y tiempo de exposición del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras	74
5.3.1.1. Examinación macroscópica post-mortem de las glándulas mamarias inoculadas con aceite esencial de <i>Menthastachys verticillata</i>	74
5.3.1.2. Examinación histopatológica de las glándulas mamarias inoculadas con aceite esencial de <i>M. verticillata</i>	75
5.3.1.3. Evaluación de la dosis inmunoestimulante del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras	77
5.3.2. Efecto de la dosis y tiempo de exposición de la cepa <i>E. faecium</i> EF214 mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras	79
5.3.2.1. Examinación macroscópica post-mortem de las glándulas mamarias inoculadas con la cepa <i>E. faecium</i> EF214..	79

5.3.2.2. Examinación histopatológica de las glándulas mamarias inoculadas con la cepa <i>E. faecium</i> EF214..	82
5.3.2.3. Recuento bacteriano a partir de homogenatos de glándula mamaria inoculadas con la cepa <i>E. faecium</i> EF214..	86
5.3.2.4. Recuperación de bacterias de hígado, riñones y sangre de ratones Balb/c hembras inoculados con la cepa <i>E. faecium</i> EF214..	89
5.3.2.5. Caracterización molecular de las cepas aisladas post-inoculación...	89
5.3.3. Evaluación del efecto inmunomodulador del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> en un modelo murino de mastitis.....	91
5.3.3.1. Examinación macroscópica post-mortem de las glándulas mamarias pre-tratadas con aceite esencial de <i>M. verticillata</i> y desafiadas con la cepa <i>E. faecium</i> EF214....	91
5.3.3.2. Examinación histopatológica de las glándulas mamarias pre-tratadas con aceite esencial de <i>M. verticillata</i> y desafiadas con la cepa <i>E. faecium</i> EF214....	94
5.3.3.3 Recuento bacteriano a partir de homogenatos de glándulas mamarias pre-tratadas con aceite esencial de <i>M. verticillata</i> y desafiadas con la cepa <i>E. faecium</i> EF214....	96
5.3.3.4. Recuperación de bacterias de hígado, riñones y sangre..	98
5.3.3.5. Extracción de ARN total de glándula mamaria murina.....	98
5.3.3.6. Cuantificación de la expresión de los genes <i>tlr2</i> , <i>tnf-α</i> , <i>il-1β</i> e <i>il-10</i> ...	99
5.3.3.7. Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4 ⁺ /CD69 ⁺ y CD8 ⁺ /CD69 ⁺).....	109
5.3.3.8. Evaluación de anticuerpos totales (IgM, IgG e IgA) específicos para la cepa <i>E. faecium</i> EF214 en glándulas mamarias y suero....	113
6. CONCLUSIONES.....	116
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXO I: Identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>M. verticillata</i>	132

ANEXO II: Seguimiento de ratones Balb/c hembras y optimización de la inoculación intramamaria en un modelo murino.....	135
ANEXO III: Curva de crecimiento cepa <i>E. faecium</i> EF214.....	139
8. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	141
8.1. Publicaciones en revistas	141
8.2. Resúmenes publicados.....	141
8.3. Trabajos enviados a revistas	142

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Volúmenes de los componentes empleados en la reacción de transcripción inversa.....	52
Tabla 2: Volúmenes y concentración de los reactivos empleados en la reacción de PCR en Tiempo Real.....	53
Tabla 3: Programa empleado en la reacción de PCR en Tiempo Real.....	53
Tabla 4: Primers utilizados en las reacciones de PCR en Tiempo Real.....	53
Tabla 5: Cuantificación del ARN extraído de las glándulas mamarias abdominales derechas (GMR4) e izquierdas (GML4) de ratones Balb/c hembras en período de lactancia.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de la estructura externa de la ubre de la vaca.	5
Figura 2: Esquema representativo de la estructura interna de una glándula mamaria o cuarto de la ubre de la vaca..	7
Figura 3: Esquema de la glándula mamaria bovina que muestra los factores anatómicos más importantes que actúan como barreras de defensa..	8
Figura 4: Diagrama esquemático de la glándula mamaria bovina. (Factores celulares y solubles que participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria)..	11
Figura 5: Estructuras químicas del isopreno (unidades básicas de los terpenos). Limoneno y germacreno..	19
Figura 6: <i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling, en su hábitat natural. Se observan hojas, tallos e inflorescencias.....	21
Figura 7: Esquema del desarrollo de la glándula mamaria en cada una de las etapas de vida del ratón.....	25
Figura 8: Esquema de ratón en posición decúbito dorsal donde se observa la disposición de las glándulas mamarias en la región torácica y abdominal.....	26
Figura 9: Equipo de hidrodestilación para la obtención de aceites esenciales.....	35
Figura 10: Anestesia de los ratones Balb/c hembras por vía intraperitoneal.	43
Figura 11: A) Sujeción del pezón con pinzas para lograr la inoculación intramamaria. B) Inoculación intramamaria. Se observa la aguja (30G) en el canal del pezón del ratón Balb/c hembra.	43
Figura 12: Disposición de las glándulas mamarias en el ratón. Se señalan las glándulas mamarias (L4 y R5) que se inocularon con Azul de Evans al 0,2%.....	44
Figura 13: Perfil cromatográfico obtenido por CG-MS del aceite esencial obtenido de la especie <i>M. verticillata</i> proveniente de la localidad de Villa Larca, Provincia de San Luis, Argentina.	59
Figura 14: Porcentaje de viabilidad de células MAC-T en función del tratamiento <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones del AE de <i>M. verticillata</i>	61
Figura 15: Efecto del AE de <i>M. verticillata</i> en la proliferación de células RAW 264.7.....	63
Figura 16: Efecto del AE de <i>M. verticillata</i> en la adherencia natural de células RAW 264.7 a la base del pocillo de una microplaca.....	64
Figura 17: Microfotografía de <i>S. cerevisiae</i> (flecha) adheridas a células RAW 264.7.....	65
Figura 18: Porcentaje de adherencia (número de células RAW 264.7 que adhirieron levaduras) en función del tratamiento <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones del AE de <i>M. verticillata</i>	65
Figura 19: Número de levaduras adheridas en función del tratamiento <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones del AE de <i>M. verticillata</i>	66
Figura 20: Microfotografía de <i>S. cerevisiae</i> (flecha) fagocitadas por células RAW 264.7.....	67
Figura 21: Porcentaje de fagocitosis (número de células RAW 264.7 que fagocitaron levaduras) en función del tratamiento <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones del AE de <i>M. verticillata</i>	67
Figura 22: Número de levaduras fagocitadas en función del tratamiento <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones del AE de <i>M. verticillata</i>	68

Figura 23: Efecto del AE de <i>M. verticillata</i> sobre la viabilidad de <i>S. cerevisiae</i> fagocitadas por células RAW 264.7.....	69
Figura 24: Dosaje de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 tratadas con AE (50 µg/ml) LPS e IFN-γ.....	70
Figura 25: Dosaje de especies reactivas del oxígeno (ROS) en cultivo de células RAW 274.7 tratadas con AE.....	71
Figura 26: Fotografías representativas de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo) y AE (25, 50 y 100 µg/ml), a distintos tiempos post-inoculación.....	74
Figura 27: A) Tamaño y B) peso promedio de las glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con AE (25, 50 y 100 µg/ml), a distintos tiempos post-inoculación.	75
Figura 28: Histopatología de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo) y AE (25, 50 y 100 µg/ml), a distintos tiempos post-inoculación..	76
Figura 29: Infiltración de PMNs en glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras, inoculadas con dos aplicaciones de AE (25, 50 y 100 µg/ml), 24 h post-inoculación	77
Figura 30: Histopatología de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con dos aplicaciones de AE (100 µg/ml), 24 h post-inoculación.....	78
Figura 31: Fotografías representativas de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo) y la cepa EF214 (1x10 ³ , 1x10 ⁵ , 1x10 ⁷ o 1x10 ⁸ UFC/ml) a distintos tiempos post-inoculación.	80
Figura 32: A) tamaño y B) peso de las glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con diferentes suspensiones de la cepa EF214, a distintos tiempos post-inoculación..	81
Figura 33: Histopatología de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo) y la cepa EF214 (1x10 ³ , 1x10 ⁵ , 1x10 ⁷ o 1x10 ⁸ UFC/ml) a distintos tiempos post-inoculación.....	83
Figura 34: Infiltración de PMNs en glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con diferentes suspensiones de la cepa EF214, a distintos tiempos post-inoculación..	84
Figura 35: Recuento bacteriano en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculados con diferentes suspensiones de la cepa EF214, a distintos tiempos post-inoculación..	87
Figura 36: Productos de RAPD-PCR en gel de agarosa al 1,2%. Cepas recuperadas a partir de glándula mamaria y de los diferentes órganos de ratones inoculados con la cepa EF214 1x10 ⁸ UFC/ml.	90
Figura 37: Fotografías representativas de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), la cepa EF214 (1x10 ⁸ UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 µg/ml) y del grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214), a distintos tiempos post-inoculación.....	92
Figura 38: A) Tamaño y B) peso de las glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con la cepa EF214 (1x10 ⁸ UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 µg/ml) y del grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214), a distintos tiempos post-inoculación.....	93

Figura 39: Histopatología de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 $\mu\text{g/ml}$) y del grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214), a distintos tiempos post-inoculación.....	94
Figura 40: Infiltración de PMNs en glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 $\mu\text{g/ml}$) y del grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214), a distintos tiempos post-inoculación.....	95
Figura 41: Recuento bacteriano de glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) y del grupo desafío (pre-tratadas con AE (100 $\mu\text{g/ml}$) y luego desafiadas con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml)) a distintos tiempos post-inoculación..	96
Figura 42: Expresión relativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) del receptor TLR2 en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras en periodo de lactancia..	100
Figura 43: Expresión relativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia.	103
Figura 44: Expresión relativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia..	105
Figura 45: Expresión relativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia.	107
Figura 46: A) gráficos dot plot (de puntos) y B) porcentaje de linfocitos T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ que expresan el marcador CD69 $^+$ en sangre de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, 96 h post-inoculación intramamaria con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 $\mu\text{g/ml}$) y grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214).	111
Figura 47: Anticuerpos totales (IgM, IgG e IgA) anti- EF214 en A) suero y en B) glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, 360 h (15 días) post-inoculación con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) y grupo desafío (pre-tratadas con aceite esencial y luego desafiadas con la cepa EF214)	114

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia, obtenido por la retrotranscripción de ARN

AE: Aceite esencial

anti-CD69*^{APC}: anticuerpo anti-CD69 marcado con aloficocianina (APC)

APC: aloficocianina

ARN: ácido ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

ATS: Agar Tripticasa Soya

BRM: (por sus siglas en inglés) modificadores de la respuesta biológica

CD4*^{FITC} /CD8*^{PE}: anticuerpo anti-CD4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/anti-CD8 marcado con ficoeritrina (PE)

CG-MS: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

CPA: células presentadoras de antígenos

CTS: Caldo Tripticasa Soya

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

E-selectina: moléculas de adhesión celular

FITC: isotiocianato de fluoresceína

g: gramos

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

h: horas

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IFN- γ : Interferón- γ

IIM: inoculación intramamaria

IL: Interleuquina

IRAK: receptor de IL-1

L4: glándula mamaria abdominal izquierda

LB: linfocito B

LBP: proteína de unión a LPS

LPS: lipopolisacárido

LT: linfocito T
LTc: linfocitos T CD8⁺ citotóxico
LTh: linfocitos T CD4⁺ cooperadores o helpers
MAC-T: Células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T)
MALDITOF-MS.
min: minutos
ml: mililitros
MTT: Sal de tetramiltetrazolium o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MyD88: factor de diferenciación mieloide 88
ng/ml: nanogramos por mililitros
NK: natural killer
nm: nanómetro
NO: óxido nítrico
O/N: overnight
O₂⁻: anión superóxido
O₂: oxígeno molecular
°C: grados centígrados
OCLA: Observatorio de la cadena Láctea Argentina)
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPD: O-fenildiamina dihidrocloruro
p/v: peso en volumen
PAMPs: (por sus siglas en inglés) patrones moleculares asociados a patógenos
PBMCs: (por sus siglas en inglés) células mononucleares de sangre periférica
pbMEC: células epiteliales mamarias bovinas
PBS: *Buffer* fosfato salino
PE: ficoeritrina
PMNs: neutrófilos polimorfonucleares
PRRs: (por sus siglas en inglés) receptores de reconocimiento de patrones
R4: glándula mamaria abdominal derecha
RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA PCR.
RAW 264.7: Línea celular de macrófagos murinos
RNS: (por sus siglas en inglés) especies reactivas del nitrógeno
ROS: (por sus siglas en inglés) especies reactivas del oxígeno
rpm: revoluciones por minutos

SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativos

TLRs: receptores tipo Toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α

UFC/ml: unidades formadores de colonias por mililitros

UNRC: Universidad Nacional de Río Cuarto

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1

$\mu\text{g/ml}$: microgramos por mililitros

μl : microlitros

μM : micromolar

μg : microgramos

RESUMEN

La mastitis bovina produce importantes pérdidas económicas. *Enterococcus faecium* es un patógeno ambiental implicado en la enfermedad. El control de la misma mediante la administración intensiva de antibióticos conduce a la aparición de cepas resistentes. Estudios previos han reportado la actividad inmunoestimulante del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (AE) sobre células T y B humanas. En este contexto, las sustancias inmunomoduladoras derivadas de plantas medicinales resultan ser una estrategia terapéutica prometedora. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la capacidad del AE para estimular la respuesta inmune en la glándula mamaria de ratones desafiados con patógenos causantes de mastitis bovina, para su posible aplicación como terapia alternativa en la prevención y/o control de la enfermedad.

El AE de *M. verticillata* se obtuvo por hidrodestilación por arrastre en vapor de agua. Los compuestos mayoritarios identificados fueron pulegona (51,66%), mentona (37,79%) y limoneno (1,14%). AE no afectó la viabilidad de células MAC-T y activó la fagocitosis de macrófagos murinos con producción de especies reactivas del oxígeno. La inoculación intramamaria con una sola aplicación de AE en ratones Balb/c hembras en periodo de lactancia no alteró la arquitectura del tejido mamario. El pre-tratamiento con AE (dos aplicaciones de AE 100 µg/ml) reveló que el AE no fue reconocido por TLR2, sin embargo, provocaron un aumento en la expresión de IL-1 β y TNF- α lo que indujo una leve infiltración de PMNs asociada con un cambio en la coloración de la glándula sin afectar la arquitectura, tamaño y peso de las mismas. El pre-tratamiento con AE no incrementó la expresión de IL-10 y no activó la inmunidad adaptativa celular. La cepa *E. faecium* EF214 (1×10^8 UFC/ml) inoculada por vía intramamaria no fue reconocida por TLR2. Sin embargo, logró una infección caracterizada por un número estable de bacterias, un incremento en la expresión de TNF- α e IL-1 β a las 48 y 96 h ($p < 0,05$ y $p < 0,001$) e inflamación del tejido mamario. A las 96 h también se observó un leve aumento en la expresión de IL-10 ($p < 0,05$). Además, se detectó un incremento en el número de LT CD4 $^+$ y CD8 $^+$ activados ($p < 0,01$; $p < 0,05$) en sangre y un aumento en los niveles de anticuerpos específicos en suero y glándula mamaria ($p < 0,01$ y $p < 0,001$). El pre-tratamiento con AE y posterior desafío con EF214 reveló una disminución en los parámetros inflamatorios (infiltración de PMNs y expresión de TNF- α e IL-1 β) a las 48 y 96 h ($p < 0,001$). Además, se observó un incremento significativo de IL-10 a las 96 h ($p < 0,01$). El recuento bacteriano disminuyó a partir de las 24 h, siendo significativo a las 96 y 360 h respecto al grupo inoculado con el microorganismo. No se observó incremento en el número de LT CD4 $^+$ y CD8 $^+$ activados o en la producción de anticuerpos específicos.

En conclusión, se confirma el efecto modulador del AE sobre los mecanismos de la inmunidad innata y su capacidad para controlar la infección en las primeras horas, sin activar la inmunidad adaptativa. Esta capacidad del AE indica el potencial para su posible aplicación como terapia alternativa en la prevención y/o control de la enfermedad.

ABSTRACT

Bovine mastitis causes significant economic losses. *Enterococcus faecium* is an environmental pathogen implicated in the disease. The intensive administration of antibiotics leads to the appearance of resistant strains. Previous studies have reported the immunostimulating activity of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (EO) on human T and B cells. In this context, immunomodulatory substances derived from medicinal plants turn out to be a promising therapeutic strategy. The objective of the present study was to characterize the ability of EO to stimulate the immune response in the mammary gland of mice challenged with pathogens causing bovine mastitis, for its possible application as an alternative therapy in the prevention and /or control of the disease.

M. verticillata EO was obtained by hydrodistillation by steam drag. The major compounds identified were pulegone (51.66%), menthone (37.79%) and limonene (1.14%). EO did not affect the viability of MAC-T cells. In addition, it activated phagocytosis of murine macrophages with production of reactive oxygen species. Intramammary inoculation with a single application of EO in female lactating Balb/c mice did not alter the architecture of mammary tissue. On the other hand, it was observed that EO was not recognized by TLR2 in animals that received the pre-treatment with EO (two applications of EO 100 µg/mL). However, an increase in the expression of IL-1β and TNF-α which induced a slight infiltration of PMNs associated with gland's coloration change without affecting the architecture, size and weight of the same was detected. Pre-treatment with EO did not increase the expression of IL-10 nor activate the cellular adaptive immunity. The strain *E. faecium* EF214 (1×10^8 CFU/mL) inoculated intramammary was not recognized by TLR2. However, it achieved an infection characterized by a stable number of bacteria, an increase in the expression of TNF-α as well as IL-1β at 48 and 96 h ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) and the consequent inflammation of mammary tissue was observed. A slight increase in IL-10 expression was also observed ($p < 0.05$) at 96 h. In addition, an increase in the number of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells ($p < 0.01$; $p < 0.05$) in blood as in specific antibody levels in serum and mammary gland was detected ($p < 0.01$ and $p < 0.001$). Pre-treatment with EO and subsequent challenge with EF214 revealed a decrease in the inflammatory parameters (infiltration of PMNs and expression of TNF-α and IL-1β) at 48 and 96 h ($p < 0.001$). Furthermore, a significant increase in IL-10 was observed at 96 h ($p < 0.01$). Although the bacterial count decreased after 24 h, significant differences were found was significant at 96 and 360 h compared to that observed in the group inoculated with the microorganism. No increase in the number of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells or in the production of specific antibodies was observed.

In conclusion, the modulating effect of EO on the mechanisms of innate immunity and its ability to control infection in the first hours is confirmed, without activating adaptive immunity. This capacity of EO indicates the potential for its possible application as an alternative therapy in the prevention and/or control of the disease.

RECURSOS FINANCIEROS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS

1. Proyecto “Estudio del potencial inmunomodulador de sustancias activas obtenidas de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, una planta medicinal argentina, como estrategia en la prevención de la mastitis bovina”. Investigador responsable: Dra. Elina Reinoso (UNRC). Grupo responsable: Dra. Laura Noelia Cariddi (UNRC). Subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – FONCYT PICT-2013 N° 2268 Año: 2014-2017. Monto: \$ 191.772.
2. Proyecto PIP N° 261: “Caracterización de una mutante de *Streptococcus uberis* deficiente en el gen sua como posible uso vacunal frente a infecciones intramamarias”. Titular: Dra. Elina Reinoso. Co-Titular: Dra. Noelia Cariddi. Otorgado por CONICET. Período: 2014-2018. Monto: \$ 50.000.
3. Proyecto “Plantas medicinales como estrategias de control de enfermedades infecciosas de interés agroalimentario. SECyT-UNRC. Período: 2015-2017. Res. 161. Directora: Dra. Elina Reinoso. Monto: \$13.000. Correspondiente al Programa “Programa interdisciplinario de seguridad y calidad de sistemas agro-alimentos”. Investigador responsable: Dra. Elina Reinoso.
4. Proyecto PIP: “Aplicación del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* y evaluación de su potencial antimicrobiano para el control de la mastitis bovina” Director: Dra. Elina Reinoso (UNRC), Co-Director: Dra. Noelia Cariddi. Otorgado por MinCyT Gobierno de la Provincia de Córdoba Período: 2018-2019. Monto: \$200.000. Res N° 000099/2017.

INTRODUCCION

1.1 Mastitis bovina

La mastitis bovina es un proceso inflamatorio en los tejidos de la glándula mamaria, en respuesta a una agresión causada con mayor frecuencia por agentes patógenos y en menor medida por traumatismos o lesiones e irritaciones de origen químico (Chaves, 2010). La mastitis se considera una enfermedad multifactorial porque el riesgo de infección está relacionado con el sistema inmunológico de la vaca, el inóculo y la virulencia del microorganismo y las condiciones ambientales (Corbellini, 2002).

A nivel mundial, la mastitis es considerada como la enfermedad del ganado vacuno que causa las mayores pérdidas económicas tanto al productor como a la industria láctea (Reneau y Packard, 1991; Hogeveen *et al.*, 2011; Hadrich *et al.*, 2018). Las grandes pérdidas que ocasiona se deben, a una marcada disminución en la producción de leche, mayores costos por separación de animales, gastos en antibióticos, leche descartada, servicios veterinarios, el trabajo extra y la reducción del valor biológico de la leche (Reneau y Packard, 1991; Philpot y Nickerson, 1992; Silva *et al.*, 2012). En Argentina, como consecuencia de esta enfermedad, se estima que las pérdidas económicas ascenderían a 20 millones de pesos mensuales (Castro, 2018).

Las áreas principales de producción lechera están localizadas en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos, donde se concentran la mayor cantidad de tambos y abastecen cerca del 90% de la leche producida a nivel nacional. Según datos aportados en marzo de 2017 por el OCLA (Observatorio de la Cadena Láctea Argentina), en ese año había 11.326 tambos, que se distribuían en un 35,1% en Santa Fe, 30,0% en Córdoba, 22,1% en Buenos Aires y 7,6% en Entre Ríos.

Históricamente, la producción primaria se caracterizó por tener un comportamiento cíclico influenciado por continuas crisis ligadas a la evolución del mercado interno. Durante los años 70 y 80, el crecimiento de la producción primaria de leche ha sido paulatino a un ritmo promedio del 2,6% anual, pasando a un promedio del 5% anual a partir de la década del 90 (Castellano *et.al*, 2009). En el período comprendido entre los años 2008 y 2011 la producción lechera en Argentina aumentó un 15,9%. (Sanchez *et al.*, 2012). El OCLA en su informe de coyuntura número 9 (marzo de 2019) reportó que la producción lechera en 2018 experimentó un aumento de un 4,2% respecto al 2017. Sin embargo, el primer bimestre del 2019 se vio afectado por una disminución en la producción láctea, lo que lleva a prever un 2019 con una producción del 1% menos respecto del 2018.

Dado el importante desarrollo de la industria láctea nacional, todos los esfuerzos se centralizaron en mejorar la calidad higiénica y sanitaria a través de un mayor control de la mastitis. El mejoramiento de la calidad de la leche y los derivados lácteos que se producen en nuestro país es prioritario teniendo en cuenta un potencial aumento de la capacidad exportadora del sector, principalmente en el marco del Mercosur. Por otro lado, las exigencias del consumidor interno son cada vez mayores en cuanto a calidad de los productos se refiere (Calvinho y Tirante, 2005).

El equipo de investigación de la Orientación Genética Microbiana de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) trabaja desde 1986 en distintas líneas de investigación relacionadas al estudio de patógenos como a la búsqueda de estrategias de control para la mastitis bovina. Entre las líneas de trabajo se destacan investigaciones en cepas de *S. aureus* y *S. uberis* (Reinoso *et al.*, 2002, 2004a,b, 2005, 2006; Odierno *et al.*, 2006; Reinoso *et al.*, 2007, 2009, 2011a,b; Lasagno *et al.*, 2012). Se han descrito mutantes atenuadas en virulencia (Reinoso, 1997) y experimentos en modelos animales mostraron que la mutante es capaz de diseminarse hacia diferentes órganos en el ratón (Reinoso *et al.*, 2002). Estudios epidemiológicos moleculares en 212 cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes orígenes (alimentos, mastitis bovina, infecciones y microbiota de humanos) permitieron diferenciar poblaciones genotípicamente diferentes de acuerdo al origen (Reinoso *et al.*, 2004a,b-2007; Odierno *et al.*, 2006). Asimismo, se investigó la expresión *in vitro* de potenciales factores de virulencia y los perfiles genéticos de cepas de *S. uberis* y *S. aureus* aisladas de casos clínicos y subclínicos (Reinoso *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2009; Lasagno *et al.*, 2011; Reinoso *et al.*, 2011a,b).

1.1.1. Características de la enfermedad

Respecto al tiempo de duración, la mastitis se puede clasificar en aguda o crónica, mientras que en relación a las manifestaciones clínicas puede ser clínica o subclínica. La forma clínica de la mastitis muestra varios signos y síntomas tales como, inflamación de la glándula mamaria, dolor, rigidez, aumento de la temperatura, y la leche presenta alteraciones macroscópicas comparadas con la leche de una vaca sana. La vaca se vuelve menos productiva, en algunos casos puede progresar a la septicemia y posteriormente la muerte. La mastitis subclínica es la forma más prevalente y se caracteriza por no mostrar cambios visibles en las características macroscópicas de la leche (Bandoch y Melo, 2011; Oliveira *et*

al., 2011). Como no presenta síntomas o signos es más perjudicial que la forma clínica porque la infección bacteriana puede convertirse en crónica (Langenegger *et al.*, 1981).

1.1.2. Agentes causales de mastitis

La mastitis se asocia generalmente con la presencia de un agente infeccioso. Un gran número de agentes microbianos entran en contacto con la ubre y tienen la oportunidad de ingresar en la glándula mamaria a través del canal del pezón (Bradley, 2002). La infección puede ocurrir en cualquier etapa, tanto durante la lactancia como en el período seco, sin embargo, las vacas en lactancia temprana tienen un mayor riesgo de nuevas infecciones debido al aumento del estrés y la supresión inmunológica asociada con el período posparto (Petersson-Wolfe y Currin, 2012).

Se han identificado más de 80 agentes causales de mastitis, incluyendo especies de bacterias, hongos, micoplasmas y algas (Watts, 1988). Sin embargo, la mayoría de las infecciones son causadas por bacterias. Estos organismos han sido clasificados en a) patógenos contagiosos b) patógenos ambientales c) patógenos oportunistas y d) patógenos que causan mastitis con menos frecuencia (Langoni *et al.*, 2011).

Los microorganismos contagiosos se encuentran generalmente en la ubre o en la superficie de los pezones de las vacas, son la principal fuente de infección y se transmiten de cuartos infectados a cuartos no infectados y de animal a animal principalmente durante el ordeño. Los principales microorganismos contagiosos son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y especies de *Mycoplasma*, *S. aureus* es la especie contagiosa aislada más frecuentemente (Oliveira *et al.*, 1998).

Los patógenos ambientales son aquellos cuyo reservorio primario es el medio ambiente que rodea a los animales, constituyen un grupo heterogéneo de géneros y especies bacterianas, tales como *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y bacterias coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* y *Enterobacter aerogenes*) (Schroeder, 2012). Entre las bacterias ambientales, los estreptococos y los enterococos son importantes agentes causales de infección intramamaria, y son los principales patógenos responsables del alto recuento de células somáticas en tanques lecheros a granel en tambos de rodeos manejados adecuadamente (Smith y Hogan, 1993; Carrillo-Casas y Miranda-Morales; 2012 Reinoso, 2017).

La mastitis causada por organismos ambientales es esencialmente oportunista en su naturaleza, se produce cuando el sistema inmunológico del hospedador está deprimido o cuando no se practica un adecuado saneamiento e higiene durante o luego del ordeño (Schukken *et al.*, 2005).

Las especies del género *Enterococcus* se han aislado del tracto gastrointestinal y el urogenital de los mamíferos. La tolerancia elevada a las condiciones adversas y la resistencia antimicrobiana inherente y adquirida que presentan los enterococos, le permiten ocupar una gran variedad de nichos en el medio ambiente que rodea a la vaca. Comúnmente se encuentran en el estiércol del ganado lechero, por lo que la limpieza deficiente de la ubre, el manejo inadecuado de los establos y los pezones dañados aumentan el riesgo de propagación de enterococos a vacas no infectadas (Petersson-Wolfe y Currin, 2012).

Diferentes autores han informado que los enterococos fueron el agente causal de entre el 8 al 13% del total de las infecciones intramamarias (Aleksieva y Todorov, 1981; Giannechini *et al.*, 2002). Por otro lado, estudios recientes sugieren que los aislamientos de enterococos en casos de mastitis bovina fue en aumento desde un 0 (Østerås *et al.*, 2006) a un 46% (Kateete *et al.*, 2013; Gürlér *et al.*, 2015). *E. faecium* y *E. faecalis*, han sido las especies más frecuentemente aisladas de vacas con mastitis (Smith y Hogan, 2003; Carrillo-Casas y Miranda-Morales, 2012).

Un tercer grupo lo constituye los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN), considerados patógenos oportunistas, ya que son integrantes de la microbiota de piel de la ubre y los pezones, pero también pueden causar infecciones del canal del pezón y la glándula mamaria. La distribución dentro de los rodeos lecheros de las distintas especies que conforman este grupo reflejan, en parte, las prácticas de manejo aplicadas en cada establecimiento (Calvinho, 2010).

Existen otras bacterias e incluso levaduras que causan mastitis con menos frecuencia. La infección se produce si cambian las condiciones del entorno y aumenta la exposición a estos microorganismos. Algunos ejemplos son *Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia asteroides*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Bustos Saggio, 2018).

1.2. Anatomía de la glándula mamaria de la vaca

1.2.1. Estructura externa

La ubre bovina está constituida por cuatro glándulas de origen dérmico, es considerada como una glándula sudorípara modificada. Las cuatro glándulas mamarias, también denominados cuartos, están íntimamente unidas pero separadas por membranas específicas que dividen las glándulas anteriores de las posteriores, sin embargo cada una es una unidad funcional en si misma que opera independientemente y drena la leche por medio de su propio canal (Avila Téllez y Romero, 2010). La ubre presenta un sistema de suspensión que la mantiene prácticamente adosada en la pared abdominal. Este sistema está formado por tejido conectivo, ligamentos suspensorios (medio y lateral) y la piel, que colabora en la suspensión, protege y brinda estabilidad a la glándula mamaria. Si la vaca se observa desde atrás, un surco medial divide a la ubre en dos mitades, derecha e izquierda. En este surco se ubica el ligamento suspensorio medio, constituido por tejido elástico que amortigua ante movimientos de la vaca, también se adapta a los cambios de tamaño y peso de la ubre por la producción de la leche. La fortaleza de los ligamentos es importante porque ayuda a prevenir la formación de una ubre colgante, minimiza el riesgo de lesiones y evita dificultades durante el ordeño (Gasque Gómez, 2008) (**figura 1**).

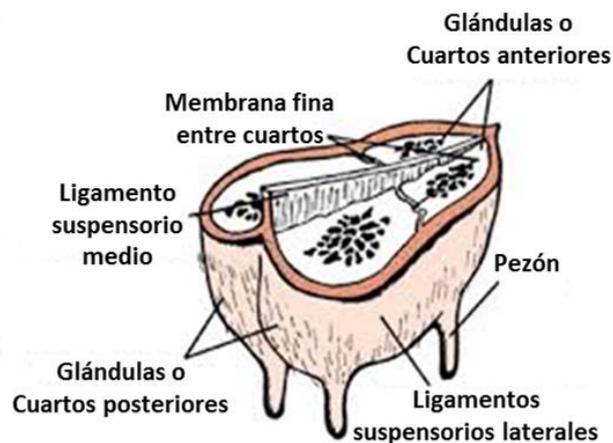


Figura 1: Esquema representativo de la estructura externa de la ubre de la vaca. En la figura se observa el sistema de suspensión de la ubre y las membranas que separan anatómicamente las cuatro glándulas mamarias o cuartos de la ubre. (Fuente: Castro, 1999)

1.2.2. Estructura interna

La ubre está compuesta por cuatro cuartos o glándulas mamarias. Cada glándula es una unidad anatómicamente independiente y está formada por dos estructuras: el parénquima y el estroma. El parénquima es la parte secretora de la glándula y está constituido por los sistemas alveolar y tubular (ductal). El estroma está formado por los tejidos adiposo y conectivo. Toda la ubre está irrigada e inervada por el sistema sanguíneo y nervioso, respectivamente, presentando además, nódulos que forman parte del sistema linfático. La glándula mamaria es una glándula exocrina, debido a que la leche es sintetizada en células especializadas y luego secretada fuera del cuerpo por medio de un sistema de conductos. Las células productoras de leche son células epiteliales (lactocitos) que se agrupan en una unidad funcional llamada alveolo. El alveolo, es una pequeña vesícula constituida por una sola capa de células que rodean una cavidad central, el lumen. Cada alveolo está irrigado por pequeños capilares y vénulas. Además, está rodeado por células musculares contráctiles denominadas células mioepiteliales. El alveolo es el encargado de recibir los nutrientes de la sangre, transformarlos en nutrientes de la leche y por último, descargar la leche producida en la luz del alveolo. La estructura de los alveolos mamarios varía de acuerdo a la etapa en la que se encuentre la hembra (gestación, lactancia e involución mamaria). Durante la lactancia, 150 a 220 alveolos se disponen en racimos para formar los lobulillos. Cada lobulillo, está rodeado por una cápsula de tejido conjuntivo y se reúnen formando un lóbulo. Cuando las células mioepiteliales que rodean a los alveolos se contraen en respuesta a la hormona oxitocina, éstos vacían su contenido en ductos o conductos de pequeño calibre los cuales se unen para formar otros de calibre cada vez mayor. Estos ductos reciben su nombre de acuerdo a su ubicación: los intralobulillares de calibre pequeño, se encuentran dentro del lobulillo y desembocan fuera del mismo en los ductos interlobulillares que se unen para formar el ducto intralobular que al salir del lóbulo recibe el nombre de interlobular. De la confluencia de varios de estos ductos interlobulares se forman grandes conductos llamados galactóforos, que confluyen en la cisterna de la glándula, una cavidad situada encima de la base del pezón, de forma circular, paredes muy elásticas y de tamaño variable donde se almacena la leche para luego mediante una constricción circular desembocar en la cisterna del pezón, la cual se abre al exterior a través de un canal, donde se encuentra la “Roseta de Fürstemberg”, una estructura de pliegues epiteliales cuya función es prevenir el drenaje natural (por gravedad) de la leche, así como la entrada de microorganismos y sustancias extrañas a la glándula (Avila Téllez y Romero, 2010).

En la **figura 2**, se presenta un esquema de la organización interna de una glándula mamaria o cuarto de la ubre de la vaca.

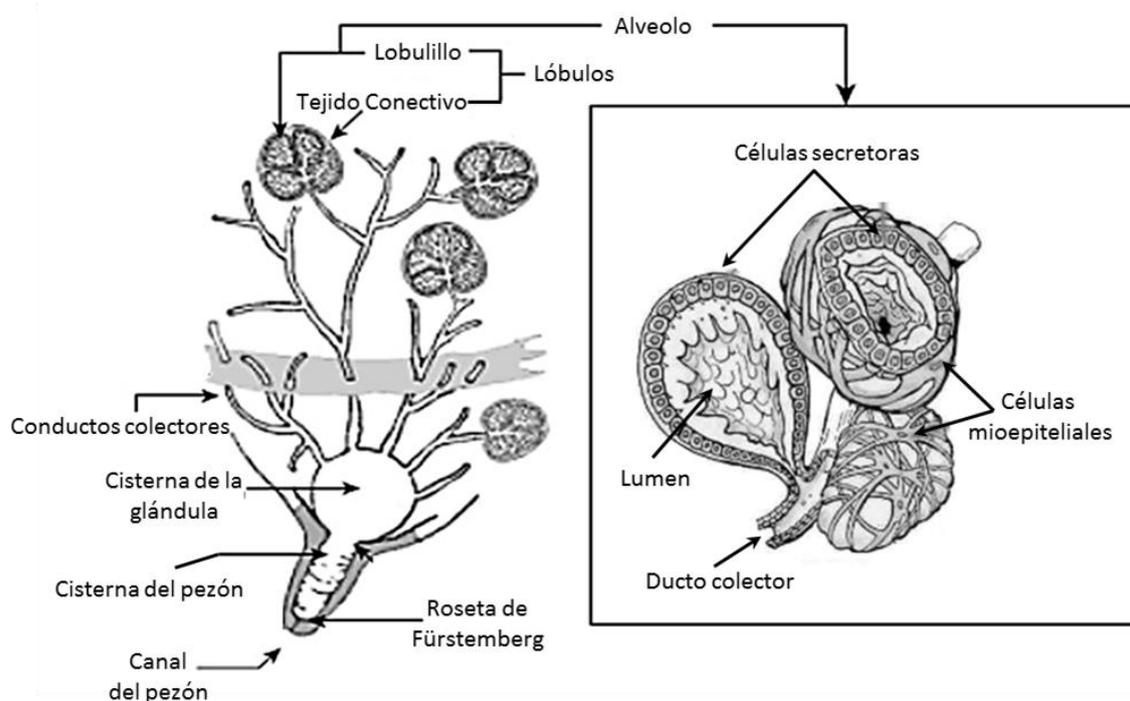


Figura 2: Esquema representativo de la estructura interna de una glándula mamaria o cuarto de la ubre de la vaca. En la figura se observa la disposición de alveolos en lobulillos, para luego formar lóbulos y el sistema colector de la leche. (Fuente: Adaptado de Avila Téllez y Romero, 2010)

1.3. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina

El ganado lechero está expuesto a numerosos factores genéticos, fisiológicos y ambientales que pueden poner en peligro la inmunidad del huésped y aumentar la incidencia de mastitis. La glándula mamaria bovina tiene mecanismos de defensa contra los patógenos invasores, al mismo tiempo que la incidencia de mastitis aumenta cuando estos mecanismos están deteriorados. (Hopster *et al.*, 1998; Waller, 2002). Los mecanismos se clasifican en: inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata es el sistema de defensa predominante durante las primeras etapas de la infección. La respuesta inmune innata está presente o se activa rápidamente en el sitio de la infección por numerosos estímulos, pero no aumenta con la exposición repetida del mismo antígeno. Si los mecanismos de defensa innata funcionan adecuadamente, la mayoría de los patógenos son eliminados fácilmente en un período corto de tiempo, incluso antes de que la respuesta inmune adaptativa se active. La eliminación rápida de las bacterias

no da lugar a cambios en la calidad de la leche. Las defensas innatas de la glándula mamaria están mediadas por las defensas anatómicas (barreras físicas), macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), células *natural killer* (NK) y ciertos factores solubles (citoquinas pro-inflamatorias, lactoferrina, entre otros) (Sordillo y Streicher, 2002).

Las defensas anatómicas como el canal del pezón y la piel son consideradas la primera barrera de defensa contra los patógenos. El pezón cuenta con un esfínter muscular que mantiene cerrado el canal entre ordeñes y está cubierto por queratina. Ambas barreras evitan la migración bacteriana hacia la cisterna de la glándula mamaria (**figura 3**). Además, los ácidos grasos y las proteínas catiónicas asociadas a la queratina presentan actividad bacteriostática y bacteriolítica (por unión a la pared celular del patógeno), respectivamente. Por estas razones, el canal del pezón se considera una importante barrera contra las infecciones intramamarias (Sordillo y Streicher, 2002).

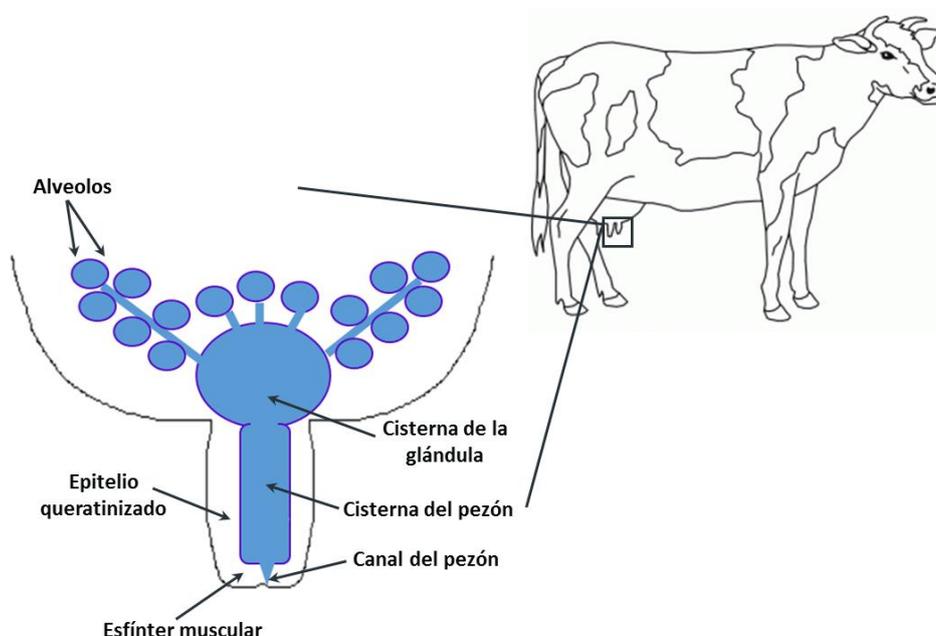


Figura 3: Esquema de la glándula mamaria bovina que muestra los factores anatómicos más importantes que actúan como barreras de defensa. (Fuente: Adaptado de Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Si las bacterias son capaces de superar esta barrera física y penetrar en la glándula, la segunda línea de defensa, constituida por los macrófagos, PMNs, y linfocitos, que regulan tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Soltys y Quinn, 1999; Sordillo y Streicher, 2002).

Los macrófagos son la población celular principal en la leche y en el tejido sano de la glándula mamaria, mientras que las secreciones y tejidos infectados contienen principalmente PMNs (Niemiłowski *et al.*, 1988).

Durante la infección intramamaria, la inmunidad antibacteriana comienza con una respuesta innata temprana generada por el reconocimiento de las bacterias invasoras por parte de las células dendríticas y macrófagos presentes en el tejido mamario, se desencadena el proceso de fagocitosis que sigue una serie de pasos definidos entre los que se menciona el reconocimiento, la internalización del patógeno y los mecanismos microbicidas producidos para eliminarlo (Aderem y Underhill, 1999; Akira *et al.*, 2006; Kawasaki y Kawai, 2014).

Los patógenos presentan “motivos conservados” que no se encuentran en los eucariotas superiores, se incluyen por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico que se expresan en la superficie de bacterias y reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) (Fainboim y Geffner, 2017). Al mismo tiempo que las células dendríticas y macrófagos presentan en su superficie celular numerosos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) que reconocen motivos conservados en los microorganismos patógenos, los receptores tipo Toll son ejemplo de ellos (TLRs) (Abbas *et al.*, 2012).

Los TLRs se expresan además, en muchos tipos de células que forman parte de la respuesta inmune innata, como PMNs, células epiteliales mucosas, células endoteliales (Abbas *et al.*, 2012). Se han identificado 13 TLRs en mamíferos, aunque es posible que haya más miembros en este grupo. Los TLRs 1-9 están conservados en humanos y ratones (Kawai y Akira, 2010).

TLR2, reconoce una amplia variedad de PAMPs entre los que se incluyen lipoproteínas y peptidoglucano (presentes en la pared celular de bacterias), zimosán y fosfolipomano en *Saccharomyces cerevisiae* y *Cándida albicans*, respectivamente, y glicoinositolfosfolípidos (glicolípido presente en *Trypanosoma cruzi*). Sin embargo, TLR2 está particularmente involucrado en infecciones bacterianas reconociendo el ácido lipoteicoico de las bacterias Gram positivas (Kawai y Akira, 2010 y Mukherjee *et al.*, 2016).

Al igual que TLR2, TLR4 reconoce muchos PAMPs asociados a bacterias (LPS y lipoproteínas), virus (proteína F), hongos (mananos de *S. cerevisiae* y *C. albicans*) y protozoos (glicoinositolfosfolípidos de *T. cruzi*) (Kawai y Akira, 2010 y Mukherjee *et al.*, 2016). TLR4 forma un complejo en la superficie celular con una glicoproteína accesoria denominada MD2, que carece de dominio transmembrana, y colabora en la interacción con LPS. Existen también proteínas adicionales como la proteína de unión a LPS (LBP) y CD14. LPS interacciona en primer lugar con LBP, facilitando la unión con CD14 (que al igual que MD2 es una proteína de superficie). Una vez que LPS se une a CD14, se disocia de LBP y el complejo LPS-CD14 se asocia físicamente al complejo TLR4-MD2 (Kawai y Akira, 2010;

Abbas *et al.*, 2012). Esto pone en evidencia el importante papel que juegan los TLRs en el reconocimiento del organismo invasor. Después de la unión a los PAMPs, los TLRs sufren cambios conformacionales para unirse a moléculas adaptadoras presentes en el citoplasma celular. La primera proteína reclutada es el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), que presenta dos dominios, un dominio TIR, mediante el cual se une a los TLRs y un dominio de muerte, mediante el cual recluta una segunda proteína quinasa, asociada al receptor de IL-1 (IRAK) que durante la interacción se autofosforila y se disocia de MyD88 para activar al factor asociado a TNF-R6 (TRAF6), que luego activa la cascada de la quinasa I κ B, lo que origina una activación del factor de transcripción NF- κ B. En resumen, el reconocimiento del patógeno por parte de los TLRs desencadena una cascada de señales intracelulares que origina la activación NF- κ B, que se transloca al núcleo para activar la producción de citoquinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina 1 β (IL-1 β), quimioquinas (CXCL10) y receptores para quimioquinas como CCR1 y CXCR4, promoviendo el reclutamiento de PMNs hacia la glándula e iniciando así la respuesta inflamatoria que contribuye a eliminar el patógeno (Rainard, 2003; Akira *et al.*, 2006; Abbas *et al.*, 2012; Greef *et al.*, 2013). Las células epiteliales también juegan un papel importante en el reclutamiento de PMNs al sitio de la infección produciendo TNF- α , IL-6 e IL-8 (Rainard y Riollot, 2003). TNF- α e IL-1 β activan la expresión de moléculas de adhesión celular (E-selectina), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) en las células endoteliales. Mediante estas moléculas los PMNs de la sangre se unen al endotelio de los vasos sanguíneos, migran a través de la matriz epitelial y subepitelial, y se localizan finalmente en el sitio de la infección o en la leche. Para el reclutamiento de PMNs, es necesaria la participación de moléculas quimio attractantes tales como componentes del complemento (C3a y C5a), otras quimioquinas y citoquinas (IL-8, IL-12) (Nishimura, 2003; Strindhall *et al.*, 2005) (**figura 4**).

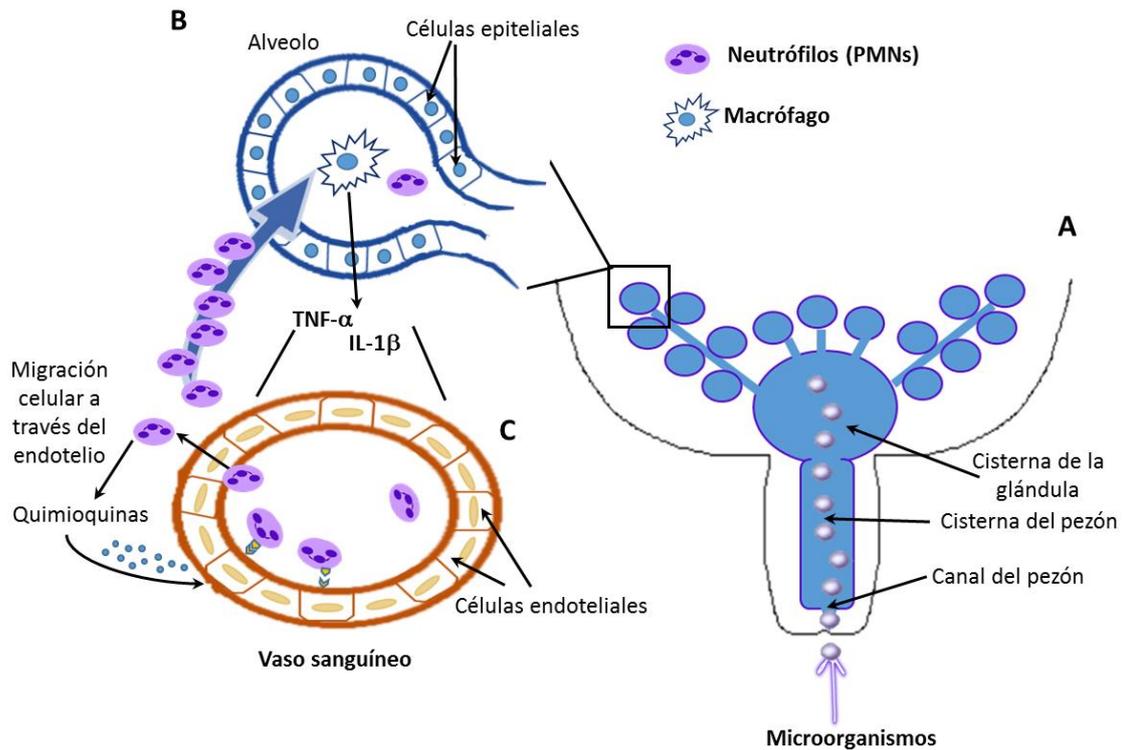


Figura 4: Diagrama esquemático de la glándula mamaria bovina. **A)** Los microorganismos penetran a la glándula mamaria a través del canal del pezón. **B)** Factores celulares y solubles que participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria. Los macrófagos localizados en los alvéolos fagocitan las bacterias que entran en la cisterna de la glándula mamaria. Los macrófagos activados liberan quimioquinas (como IL-8) y citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α e IL-1 β . **C)** Células endoteliales de vasos sanguíneos adyacentes a los alvéolos expresan moléculas de adhesión en respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias; esto, a su vez, facilita el reclutamiento de PMNs desde el torrente sanguíneo hasta el sitio de la infección con el fin de eliminar las bacterias invasoras (Fuente: Adaptado de Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Los PMNs reclutados al sitio de la infección son las células principales encargadas de realizar la fagocitosis de los microorganismos patógenos. El número de macrófagos en la glándula mamaria tiende a ser más bajo durante la inflamación, y su tasa de fagocitosis disminuye en comparación con los PMNs. Sin embargo, la función de los macrófagos es fundamental para iniciar el proceso inflamatorio esto no se entiende o podría mejorarse ver paper original (Niemialtowski *et al.*, 1988; Paape *et al.*, 2003).

Luego del reconocimiento del patógeno por los PMNs y por los macrófagos, las señales generadas inducen el reordenamiento del citoesqueleto de actina que conduce a su polimerización debajo de la membrana en el sitio de contacto, entonces secciones de membrana rica en actina se extienden hacia afuera y rodean al patógeno, las membranas se fusionan y se internalizan, formándose el fagosoma que contiene al patógeno, se fusiona con los lisosomas originan los fagolisosomas y se activan los mecanismos microbicidas para

eliminar al patógeno (Underhill y Ozinsky, 2002). Los mecanismos involucrados son dependientes del oxígeno (requieren la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno) e independientes del oxígeno.

Mecanismos dependientes del Oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son generadas por diferentes enzimas:

- ✓ *La enzima NADH-oxidasa* que se ensambla principalmente en la membrana del fagolisosoma, que reduce el oxígeno molecular (O_2) a anión superóxido (O_2^-).
- ✓ *La enzima superóxido dismutasa* cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es utilizado por la enzima mieloperoxidasa para producir, en presencia de iones haluros (I^- y Cl^-), compuestos halogenados (hipohaluros) como ácido hipocloroso (HClO) e hipoiodoso (HIO), que son muy tóxicos para las bacterias. El proceso por el cual se generan las ROS se denomina “estallido respiratorio”.

Las especies reactivas del nitrógeno (RNS) son producidas por:

- ✓ *La enzima citosólica óxido nítrico-sintetasa* (NOS) que cataliza la conversión de arginina en citrulina liberando óxido nítrico (NO). El NO puede combinarse con H_2O_2 u O_2^- generados por la NADH-oxidasa para producir radicales de peroxinitrito ($ONOO^-$), isómero inestable del nitrato (NO_3), muy reactivos que pueden destruir microorganismos.

Mecanismos independientes del Oxígeno

Dependen de proteínas antimicrobianas preformadas y acumuladas en los lisosomas de los PMNs o macrófagos activados, como por ejemplo lisozima, fosfolipasas, proteasas, entre otras (Abbas *et al.*, 2012).

Los mecanismos microbicidas de los PMNs y macrófagos se limitan en gran medida a las vesículas intracelulares (lisosomas y fagolisosomas) para proteger a las propias células de la lesión, sin embargo las ROS, el NO y las enzimas lisosómicas también pueden liberarse en los tejidos adyacentes, donde si bien destruyen los microorganismos extracelulares, también pueden lesionar los tejidos normales. Una vez controlada la infección, los macrófagos activados eliminan los tejidos muertos e inducen la formación de tejido de reparación mediante la secreción de factores de crecimiento (TGF- β) que estimulan la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágeno y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Abbas *et al.*, 2012).

Además, de las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por macrófagos y células epiteliales de la glándula, existen otros factores solubles, como la lactoferrina que forma parte de la defensa de la glándula mamaria. La lactoferrina es una proteína con capacidad para fijar el hierro (Fe) en presencia de bicarbonato, es producida por las células epiteliales, macrófagos y PMNs. En leche normal, su concentración es baja, pero se incrementa durante la involución de la glándula o durante algún proceso inflamatorio. La lactoferrina inhibe el crecimiento de bacterias dependientes de hierro, limitando significativamente el crecimiento de bacterias productoras de mastitis (Sordillo y Streicher, 2002; Tizard, 2009).

Si bien la respuesta inflamatoria desencadenada por los diferentes factores inmunitarios conduce a la eliminación de patógenos, es fundamental la regulación del proceso, porque podrían resultar perjudiciales y mortales si no son controlados (Di Gioia y Zanoni, 2015).

La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria, secretada principalmente por un tipo de macrófagos (M2) que aparecen al final de la inflamación, aunque linfocitos T (LT), linfocitos B (LB), mastocitos y queratinocitos también sintetizan IL-10. Esta citoquina se produce tardíamente (en comparación con otras citoquinas) en la respuesta inmune innata. Su función es regular la respuesta inmunitaria del hospedador, mediante la supresión en los macrófagos y células dendríticas activadas de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , e IL-12, también inhibe, no solo el reclutamiento de PMNs al sitio de la infección, sino también la capacidad fagocítica y bactericida de estas células, contribuyendo a la disminución del daño tisular (Redpath *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2017). Por otro lado, contribuye en la regulación de los mecanismos de la presentación de antígenos. La expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II) y co-estimuladoras (CD86) en la membrana de los macrófagos activados es disminuida por IL-10 afectando la capacidad de los macrófagos como células presentadoras de antígenos (CPA), lo que impide la proliferación de LTh1 y en consecuencia disminuye los mecanismos de la inmunidad celular (Redpath *et al.*, 2001; Abbas *et al.*, 2012).

En resumen, los efectos biológicos de IL-10 se deben principalmente a su capacidad para disminuir las respuestas originadas por los macrófagos y devolver el sistema a su estado de reposo cuando la infección se ha erradicado (Abbas *et al.*, 2012).

Todo lo detallado anteriormente, indica que las defensas innatas intentan contener o eliminar al patógeno invasor, sin embargo, si un patógeno es capaz de evadir o no es completamente eliminado por este sistema, simultáneamente ocurre el procesamiento y la

presentación del antígeno a los LT, por parte de las CPA, lo que da inicio a la respuesta inmune adaptativa (Tizard, 2009).

Los linfocitos son capaces de reconocer antígenos a través de receptores específicos de membrana, lo que define las características de especificidad, diversidad y memoria del sistema inmunológico. Existen dos grupos principales de linfocitos, los T y los B productores de anticuerpos que ayudan a la eliminación de antígenos exógenos (Tizard, 2009). Los LT pueden ser clasificados además como $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$, estos últimos también denominados LT reguladores.

Los LT que expresan el receptor T (TCR) $\alpha\beta$ incluyen a los $LT\ CD4^+$ y $CD8^+$. Los $LT\ CD4^+$ son activados en respuesta al reconocimiento del complejo péptido-CMH II presente en las CPA como células dendríticas, macrófagos o LB. Las células dendríticas son las células presentadoras más eficaces para iniciar las respuestas de los $LT\ CD4^+$ vírgenes. Los $LT\ CD8^+$ son activados en respuesta al reconocimiento del complejo péptido-CMH I presente en CPAs (Gamberale, 2005).

La presentación antigénica por parte de las CPA a los $LT\ CD4^+$ vírgenes, los diferencia en $LT\ CD4^+$ cooperadores o *helpers* (LTh) efectoros. El tipo de antígeno procesado y presentado determina el tipo de citoquinas secretadas y el perfil de diferenciación de estos linfocitos, así, los LTh estimulados por IL-12 e interferón- γ (IFN- γ) se diferencian en LTh1 y producen principalmente IFN- γ e IL-2, IFN- γ actúa sobre macrófagos activando la fagocitosis y la actividad bactericida; también estimula a las células NK y a los $LT\ CD8^+$, lo que favorece a la destrucción de microorganismos intracelulares por parte de estas células (Abbas *et al.*, 2012). Por lo tanto, los LTh1 intervienen en la inmunidad celular para la eliminación de microorganismos intracelulares (Gamberale, 2005; Abbas *et al.*, 2012). Cuando los LTh son estimulados por IL-4 se diferencian en LTh2 y producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 las cuales tienen efecto sobre la activación de los LB, para la producción de anticuerpos. Los LTh estimulados por IL-21, se diferencian en LTh foliculares (LTfh), los cuales cooperan con los LB para la síntesis de anticuerpos de clase IgM, IgG e IgA. Los LB no solo responden al antígeno mediante la producción de anticuerpos, sino también actúan como CPA pudiendo capturar y procesar el antígeno, para presentárselo al LTh. De esta forma, se realiza la cooperación T-B (Fainboim y Geffner, 2017).

Los $LT\ CD8^+$ vírgenes reconocen antígenos intracelulares presentados a través de las CPA en moléculas del CMH I, estos son los principales efectores frente a infecciones virales,

aunque también actúan frente a bacterias y parásitos intracelulares. La diferenciación de LT CD8⁺ a LT CD8⁺ citotóxico (LTc) efector implica la adquisición de mecanismos para llevar a cabo la destrucción de las células, como el desarrollo de gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas como perforinas y granzimas y la expresión de proteínas de membrana como el Fas ligando (FasL). Por otro lado, los LTc tienen la capacidad de secretar citoquinas como IFN- γ y TNF- α , que activan a los LTh1 y macrófagos para inducir una respuesta inmune de tipo celular (Abbas *et al.*, 2012).

Los LT que expresan TCR $\gamma\delta$ se han descrito como células T no clásicas, porque a diferencia de la mayoría de los linfocitos T $\alpha\beta$, su activación puede ser independiente del complejo péptido-CMH, debido a que pueden unirse directamente a una amplia variedad de antígenos, secretar citoquinas pro-inflamatorias e iniciar una respuesta inflamatoria (Gao *et al.*, 2003; Lockhart *et al.*, 2006; Guzman *et al.*, 2014). En los ratones y seres humanos, las células T $\gamma\delta$ representan entre el 1 y el 5% de los linfocitos circulantes, y se encuentran en mayor proporción en el tejido epitelial (Komori *et al.*, 2006). En cambio, en los bovinos constituyen una población particular de linfocitos que representan entre un 15 a un 60% de los linfocitos circulantes, también se encuentran localizados en la piel, la glándula mamaria, órganos reproductores y pared intestinal (Tizard, 2009).

En la glándula mamaria, la inmunidad innata y adaptativa interactúan de manera coordinada con el fin de proporcionar una protección óptima contra la mastitis (Sordillo y Streicher, 2002).

1.4. Control de las infecciones intramamarias

Los programas actuales empleados en el control de mastitis bovina fueron desarrollados en la década del 60 y están basados en la higiene durante el ordeño, incluyendo desinfección de pezones post-ordeño, mantenimiento regular de la máquina de ordeño, terapia antibiótica intramamaria al inicio del período seco, detección temprana y tratamiento adecuado de casos clínicos, aislamiento o sacrificio de las vacas con infección crónica recurrentes (Hillerton y Booth, 2018). Si bien la aplicación de estas medidas ha conducido a un progreso considerable en el control de los patógenos contagiosos, varios estudios han demostrado que se logró reducir la prevalencia de patógenos contagiosos, pero la proporción de infecciones intramamarias por patógenos ambientales ha ido incrementando (Calvinho, 2007).

En ese sentido, la frecuencia de las mastitis causadas por especies pertenecientes al género *Enterococcus* fue aumentando, además que la información sobre *E. faecium* como agente de mastitis es limitada (Petersson-Wolfe *et al.*, 2009). La revisión bibliográfica, indicaría que la proteína de superficie enterocócica (esp), las sustancias de agregación (agg), las adhesinas de la pared celular (efaAfm), la gelatinasa (gelE) y la citolisina (cyl), constituyen posibles factores de virulencia de *E. faecium* (Eaton y Gasson, 2001). Las especies del género *Enterococcus* no solo son intrínsecamente resistentes a varios antibióticos como cefalosporinas, penicilinas, aminoglucósidos y quinolonas, sino también se caracterizan por su elevada capacidad de adquirir material genético externo por conjugación, por transferencia de plásmidos o transposones, intercambiando genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia entre miembros de su género y con cepas de otros géneros incluyendo bacterias Gram negativas y Gram positivas (Clewell 1990; Johnston y Jaykus, 2004; Albornoz *et al.*, 2005; Erbas *et al.*, 2016). Por otro lado, la capacidad de formar biofilm también se considera un factor de virulencia que promueve la resistencia a los antibióticos (Eaton y Gasson, 2002; Tendolkar *et al.*, 2004). Debido a que estas bacterias son patógenos ambientales y los métodos para controlar estos agentes a veces resultan inadecuados, las estrategias para su tratamiento se han centrado en el uso de antibióticos, que si bien tiene un impacto positivo en los sistemas lecheros beneficiando la salud de la ubre y la producción de la leche, su uso indiscriminado conduce a la aparición de cepas resistentes, dejando residuos en la leche con implicancias para la salud humana (Smith y Hogan 1993; Petersson-Wolfe y Currin, 2012).

Debido a que las estrategias de prevención y/o tratamiento mencionadas no resultan eficaces al 100% para combatir la mastitis y por lo tanto garantizar la inocuidad de la leche, las investigaciones se han orientado hacia el desarrollo de vacunas. Sin embargo, los intentos a nivel internacional para producir una vacuna no han resultado exitosos para prevenir completamente la ocurrencia de nuevas infecciones debido, no sólo a la diversidad de patógenos contagiosos y ambientales que colonizan el epitelio de la glándula mamaria, sino también a la dificultad para generar una respuesta inmune apropiada y efectiva (Finch *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1994).

Lo expuesto anteriormente pone en evidencia no solo las limitaciones de las medidas aplicadas tradicionalmente para controlar la mastitis, sino también las dificultades que se han presentado durante la búsqueda de una formulación de vacunas que garanticen la disminución de la frecuencia de mastitis causada por patógenos contagiosos y ambientales.

Esto ha dirigido las investigaciones actuales hacia el estudio de métodos alternativos de control para esta enfermedad.

1.5. Terapias alternativas en la prevención y/o control de la mastitis

Las terapias alternativas se aplican tanto para reforzar la terapia antimicrobiana como para aumentar las defensas naturales de la glándula mamaria.

La aplicación de compuestos inmunomoduladores para estimular la respuesta inmune de la glándula mamaria es una de las terapias alternativas más estudiada en la actualidad.

1.5.1. Inmunomoduladores

Las sustancias inmunomoduladoras o modificadores de la respuesta biológica (BRM, por sus siglas en inglés), actúan de manera no específica sobre el sistema inmune. Pueden presentar efecto inmunoestimulantes o inmunosupresores de mecanismos inmunitarios, mediante la potenciación o supresión, respectivamente. Los primeros incrementan la respuesta inmune en enfermedades infecciosas, tumores e inmunodeficiencias. Los inmunosupresores están indicados para mitigar la respuesta inmune, como por ejemplo en caso de rechazo de órganos trasplantados, enfermedades autoinmunes y alergias. La inmunoestimulación se requiere cuando la actividad natural del sistema inmunitario no es suficiente para reducir la infección (infecciones recurrentes) o cuando puede considerarse una medida terapéutica coadyuvante (como la terapia del cáncer) para restablecer el potencial del sistema inmunitario. En la terapia de las enfermedades infecciosas, potenciar una respuesta inmune normal o restaurar una respuesta inmune que se encuentra disminuida a través del uso de inmunoestimulantes, puede aumentar la resistencia del hospedador al agente infeccioso, reducir la gravedad de la enfermedad y permitir una rápida recuperación (García-Hernández *et al.*, 2009).

El uso de citoquinas y productos microbianos para estimular la respuesta inmune específica de la glándula mamaria se investiga desde hace algunos años. Las citoquinas, son proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a microorganismos y otros antígenos, actúan como inmunomoduladores endógenos porque producen señales de activación e inhibición entre las células (Wellnitz *et al.*, 2011; Morimoto *et al.*, 2012; Wallemacqa *et al.*, 2012). Diversos inmunomoduladores a base de productos microbianos como LPS de *E. coli* y células inactivadas de *Propionibacterium granulosum*

son comercializados actualmente para el tratamiento de la mastitis bovina (Giannechini *et al.*, 2011).

En los últimos años se ha incrementado el interés científico por la búsqueda de inmunomoduladores derivados de plantas medicinales. En este sentido, tanto en Argentina como en otros países del mundo, se realizan investigaciones con plantas de uso medicinal como una alternativa eficaz en el control de la mastitis bovina (Malinowski, 2002; Hu *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2010; Rasooly *et al.*, 2010; Baravalle *et al.*, 2011; Camussone *et al.*, 2013). No existen estudios en Argentina sobre inmunomoduladores que involucren el empleo de la flora autóctona como estrategia en el control de la mastitis bovina. El grupo de investigación de la Orientación Inmunología de la UNRC, trabaja desde el año 2000 en una línea de investigación dedicada al estudio de las propiedades inmunomoduladoras y citogenotóxicas de plantas medicinales de Argentina (Cariddi *et al.*, 2006-2016). Fracciones obtenidas de la especie *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling han mostrado efecto inmunoestimulante en células humanas y animales (Cariddi *et al.*, 2005-2013a),

1.6. Plantas medicinales y aromáticas

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a planta medicinal como “*toda especie vegetal en la que el todo, o una parte de la misma, está dotado de actividad farmacológica*” (OMS, 2008).

La mayoría de las plantas medicinales presentan efectos fisiológicos múltiples debido a la presencia de más de un principio activo. Estos compuestos son sintetizados por la planta para cumplir funciones específicas como adaptación a las condiciones ambientales, resistencia a la depredación de animales, herbivoría o atracción de insectos. Además, le confieren a la planta el poder curativo que se les suele asignar por la actividad farmacológica de los mismos (Núñez, 1982).

Las especies de plantas medicinales conocidas como aromáticas; sintetizan sustancias particulares que poseen aroma o sabor característico denominado aceite esencial (Bamba, 1993).

Los aceites esenciales se sintetizan en el citoplasma de ciertas células vegetales y se acumulan en diferentes partes de la planta, pudiendo localizarse en toda la planta o en un determinado órgano vegetal como las flores, hojas, frutos y hasta raíces (Ojeda, 2001; Burt, 2004).

Los aceites esenciales son mezclas complejas, normalmente líquidas, que presentan una característica: su volatilidad, por tanto son extraíbles en corriente de vapor de agua. En general son los responsables del olor de las plantas. Se definen, según la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) (1998) como: “productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre con vapor, bien por procedimientos mecánicos. El aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos. Químicamente están formados principalmente por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos), en ocasiones también derivados del fenil propano y, raramente cumarinas.

Los principales constituyentes de los aceites esenciales son los terpenos, se sintetizan a partir de unidades de isopreno (o 2-metil-1,3-butadieno) unidas en cadena. El isopreno es un hidrocarburo de 5 átomos de carbono y los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno que contienen. En los aceites esenciales se encuentran principalmente monoterpenos (10 átomos de carbono), aunque también son comunes los sesquiterpenos (15 átomos de carbono) y los diterpenos (20 átomos de carbono) estos compuestos pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos (Svoboda y Hampson, 1999).

En la **figura 5**, se observan algunos ejemplos de estructuras químicas de los componentes de los aceites esenciales.

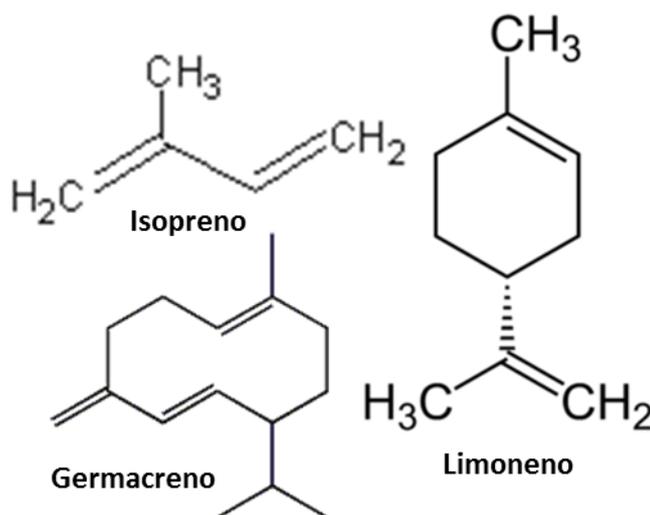


Figura 5: Estructuras químicas del isopreno. Limoneno (monoterpeno) y germacrene (sesquiterpeno).

Los aceites esenciales y sus componentes generan gran interés por la amplia aceptación de los consumidores y sus potenciales y múltiples usos (Ali *et al.*, 2013). Tanto los aceites como sus componentes han demostrado tener destacadas propiedades funcionales

en beneficio de la salud del hombre pudiendo jugar un rol muy importante en el agregado a productos alimenticios y como quimio-terápicos en enfermedades de origen humano y animal. Entre las propiedades descritas se encuentran: actividad antitumoral (Crowell, 1999), actividad antioxidante (Baratta *et al.*, 1998; Zygadlo y Juliani, 2000) actividad antimicrobiana (El-Sakhawy *et al.*, 1998; Baratta *et al.*, 1998; Zygadlo y Juliani, 2000; Demo *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2011). El aceite esencial de numerosas especies aromáticas de Argentina mostraron que efecto antimicrobiano, puesto que inhiben a bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos unicelulares (Demo *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2005).

1.7. *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling (Lamiaceae)

Se describen las características generales, los usos en medicina popular y antecedentes en investigación del uso de fracciones de la especie *Minthostachys verticillata*, una planta medicinal aromática de Argentina.

1.7.1. Generalidades

- Familia: Lamiaceae
- Subfamilia: Nepetoideae
- Tribu: Mentheae
- Género: *Minthostachys*
- Especie: *verticillata*
- Nombre científico: *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling
- Nombre común: Peperina, piperina, peperita o piperita
- Sinónimos: *Xenopoma verticillatum* Griseb.; *Bystropogon kuntzeanus* Briq., *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling var. *Eupatorioides* (Schmidt-LeBuhn, 2008)

El género *Minthostachys*, es un género taxonómicamente complejo que comprende 17 especies de hierbas aromáticas y arbustos verdes (Schmidt-LeBuhn, 2008). Crecen en Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, Noroeste y centro de Argentina (De Feo *et al.*, 1998; Schmidt-LeBuhn, 2008).

Entre las especies que componen el género se encuentran: *M. glabrescens* Epling.; *M. mollis* (Griseb.); *M. verticillata* (Griseb.) Epling.; *M. andina* (Brett.) y *M. spicata* (Benth.) Epling. La hierba aromática más popular, por su distribución y sus propiedades

benéficas es *M. verticillata* (Griseb.) Epling, popularmente conocida como peperina, pipirina, peperita o piperita (Fester *et al*, 1961; Senatore, 1998).

Es un arbusto aromático de 0,3 a 2 m de altura, con hojas oblongas de 1 a 5 cm de largo, obtusas o subagudas dispuestas formando ángulo recto. En la **figura 6** se puede observar sus flores blancas y pedunculadas, las cuales se agrupan en las axilas de las hojas y su tallo que es de sección cuadrangular, es pubescente y florece en verano. Los frutos son secos como pequeñas cápsulas con cuatro semillas diminutas por fruto. Su período de fructificación abarca los meses de marzo y abril y se cosecha en verano (Muñoz, 1987; Nuñez y Cantero, 2000).



Figura 6: *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, en su hábitat natural. Se observan hojas, tallos e inflorescencias.

En medicina popular, es utilizada, principalmente en infusiones, como estimulante, digestivo, sedativo, anti-espasmódico, antidiarréico, antihemético, carminativo, broncodilatador, antirreumático, insecticida, antimicótico y antiparasitario. También se emplea para aromatizar y fabricar licores, bebidas refrescantes y yerbas compuestas (Dimitri, 1980; Ratera y Ratera, 1980; Sorau y Bandoni, 1994; De Feo *et al.*, 1998; Núñez y Cantero, 2000).

M. verticillata está registrada en la Farmacopea Nacional Argentina y es una planta en peligro de extinción por su extracción constante e indiscriminada (Muñoz, 1987; Sagrera Ferrandiz, 1993; De Feo *et al.*, 1998).

A continuación se describen las bioactividades de fracciones derivadas de *M. verticillata* resultado de diversas investigaciones realizadas en el Departamento de Microbiología e Inmunología de nuestra UNRC.

- El extracto etanólico de *M. verticillata* posee efectos inhibitorios *in vitro* sobre la actividad citocidal del virus *Herpes suis* (Zanón *et al.*, 1999).
- El AE y la decocción de *M. verticillata*, mostraron actividad antimicrobiana *in vitro* sobre bacterias Gram positivas y propiedades antivirales sobre el virus *Herpes simplex* tipo 1 (VHS-1) y el virus de la *Pseudorabia* (VPR) cepa RC/79 (Primo *et al.*, 2001).
- El AE y la decocción de esta especie vegetal, inhibieron el crecimiento de cepas del género *Staphylococcus* aisladas de individuos con infecciones cutáneas (Maldonado *et al.*, 2001).
- La decocción de *M. verticillata* fue capaz de inhibir una de las cepas de *Helicobacter pylori* (HP788) asociada a patologías gástricas (Escobar, 2004).
- Diversos estudios *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) humana revelaron que el AE, la decocción y los compuestos mayoritarios del AE (pulegona, mentona y limoneno) ejercieron capacidad inmunoestimulante activando a células T (CD4⁺ y CD8⁺) y a células B; inhibieron la liberación de la enzima β -hexosaminidasa de basófilos de individuos alérgicos desafiados con un alérgeno específico; modularon positivamente la respuesta Th1 incrementando los niveles de IFN- γ y disminuyendo los valores de IL-13 (González Pereyra *et al.*, 2005; Cariddi *et al.*, 2006, 2007, 2009a).
- AE y decocción mostraron *in vitro* capacidad antioxidante y antiapoptótica protegiendo a las PBMCs humanas de la acción tóxica del H₂O₂ (Cariddi *et al.*, 2009b).
- Un estudio *in vivo* reveló la capacidad del AE y de uno de sus componentes mayoritarios (limoneno) para modular la respuesta de hipersensibilidad de tipo inmediata (Cariddi *et al.*, 2011b, 2013a).

Cariddi *et al.*, (2013b), mostraron el amplio espectro de actividad antibacteriana *in vitro* del AE de *M. verticillata* y de un componente mayoritario (limoneno) frente a patógenos bacterianos aislados de mastitis bovina como, *S. aureus*, *S. uberis*, *E. coli* y *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN). Además tanto AE como limoneno mostraron buena actividad bacteriostática a bajas concentraciones (los valores de CIM del AE oscilaron entre 14,3 y 114,5 mg/ml y para limoneno 3,3 y 52,5 mg/ml) y efecto bactericida a concentraciones mayores (los valores de CBM del AE oscilaron entre 114,5 y 229 mg/ml y para limoneno 210 mg/ml) frente a 7 cepas de *S. uberis* aisladas de mastitis bovina e influyeron en la formación de biofilm de estas cepas (Montironi *et al.*, 2016b). En otro estudio *in vitro* se demostró que AE inhibió el crecimiento de 2 cepas de *E. coli* (CIM de 0,9 mg/ml) y presentó actividad bacteriostática a bajas concentraciones (3,6 mg/ml) y bactericida a concentraciones más elevadas (29 mg/ml) sobre una cepa de *E. faecium* (EF214), aisladas de mastitis bovina. Por otro lado, AE afectó no solo la formación de biofilm por parte de estas cepas, sino que además mostró una buena inhibición sobre el biofilm maduro (Cerioli *et al.*, 2018).

Además, es importante destacar que los efectos tóxicos del aceite esencial y de sus componentes mayoritarios han sido evaluados *in vitro* e *in vivo* demostrando ausencia de efectos citotóxicos o genotóxicos (Sutil *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2012; Cariddi, 2013a; Escobar *et al.*, 2015).

1.8. Modelo murino de mastitis

Para el estudio de la mastitis los modelos animales bovinos, caprinos y ovinos han causado ciertas dificultades que se presentan durante la cría y manejo de estas especies debido al tamaño de los mismos, a requerimientos de espacio y alimentos y fundamentalmente a los costos económicos que representan.

Debido a estas limitantes, es necesario contar con un modelo animal simple de manipular, de bajo costo y de fácil mantenimiento en las instalaciones estándares del laboratorio. El modelo de mastitis murino fue descrito por primera vez en 1970 por Chandler, quien generó mastitis experimental en ratones a partir de inoculación intramamaria (IIM) con diferentes microorganismos causantes de mastitis. Aunque los ratones, no pueden reemplazar por completo a las vacas, el modelo murino ofrece un sistema conveniente para el estudio de la mastitis previo a la evaluación definitiva en el modelo bovino.

A continuación se describe brevemente la glándula mamaria del ratón y se destacan las similitudes con la glándula mamaria bovina.

1.9. Anatomía de la glándula mamaria del ratón

La histología de la glándula mamaria es prácticamente la misma en todas las especies. Un parénquima glandular, compuesto de alveolos y ductos, y un estroma de soporte. Cada célula alveolar se comporta como una unidad de secreción, produciendo leche completa, sintetizando y transportando desde el plasma sanguíneo las proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales minerales, anticuerpos y el agua, que son los principales constituyentes de la leche. El proceso de síntesis y de secreción es similar en todas las especies. La composición química de la leche, la disposición del sistema de almacenamiento en la glándula mamaria, la ubicación anatómica y el número de las glándulas mamarias varía entre las diversas especies (Larson, 1985).

La glándula mamaria de ratón se compone de un complejo árbol alveolar-ductal que converge en un conducto central en el pezón (Krause *et al.*, 2013). El desarrollo de la glándula mamaria del ratón ocurre durante diferentes etapas del crecimiento del animal. En el día 18,5 de gestación, se ha formado una glándula rudimentaria, compuesta de un conducto principal y 15-20 ramificaciones, la cual queda morfogénicamente en reposo hasta la pubertad (Hens y Wysolmerski, 2005) (**figura 7 A**). Esta glándula rudimentaria penetra en el mesénquima subyacente (que dará origen al tejido conectivo) y entra en contacto con pre-adipocitos que se convertirán en adipocitos, los cuales forman parte del tejido adiposo de la glándula mamaria (Sternlicht, 2006). Durante la pubertad, las señales hormonales desencadenan el alargamiento de los conductos de la glándula rudimentaria que mediante sucesivos ciclos de elongación, bifurcación y ramificación lateral, se transforman en el árbol ductal de la glándula y penetran aún más en el tejido adiposo, siendo este el tejido predominante en la glándula. El epitelio de la glándula mamaria se compone de dos capas de células, una capa interna de células epiteliales rodeada por una capa externa de células contráctiles denominadas mioepiteliales (Sternlicht, 2006) (**figura 7 B**). Durante la gestación el tejido adiposo se sustituye progresivamente por las células epiteliales que proliferan y se diferencian en alveolos productores de leche (Oakes *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2007). Durante la lactancia, el desarrollo de la glándula mamaria es tan masivo que los depósitos subcutáneos están casi completamente ocupados por grandes alvéolos productores de leche,

con un número muy pequeño de adipocitos dispersos entre ellos (Giordano *et al.*, 2017) (figura 7 C).

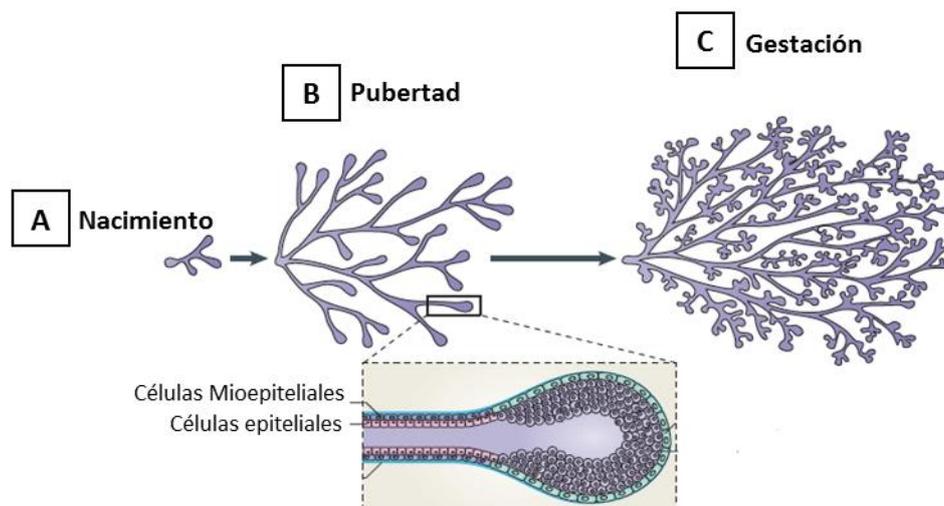


Figura 7: Esquema del desarrollo de la glándula mamaria en cada una de las etapas de vida del ratón. **A)** Glándula rudimentaria, etapa embrionaria. **B)** Por acción hormonal durante la pubertad, los conductos de la glándula rudimentaria se transforman en el árbol ductal de la glándula. En el recuadro se observan las dos capas de células que componen el epitelio mamario (células epiteliales y mioepiteliales). **C)** Durante la gestación la proliferación y diferenciación celular es mayor dando lugar a la formación los alveolos productores de leche (Fuente: Adaptado de Gjorevski y Nelson, 2011).

Finalizada la lactancia, comienza un período de remodelación tisular intensiva que corresponde a la involución normal de la glándula mamaria. En el transcurso de un período relativamente breve, una gran proporción del epitelio mamario sufre una muerte celular programada y es eliminado por los fagocitos. Luego, los depósitos subcutáneos se llenan nuevamente con adipocitos convirtiéndose en el tipo de célula predominante en el tejido mamario al final de la lactancia (Atabai *et al.*, 2007; Prokesch *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, la ubicación anatómica y el número de las glándulas mamarias varía entre las diversas especies. En el ratón, hay cinco pares de glándulas mamarias situadas justo debajo de la piel. Tres pares de glándulas se localizan en la región torácica del animal y los dos pares restantes se encuentran en la zona abdominal. La disposición de las glándulas mamarias se designó colocando al animal en posición decúbito dorsal. Del lado izquierdo, de anterior a posterior las glándulas L1, L2, L3 (región torácica) y L4, L5 (región abdominal) y de igual forma para las glándulas mamarias del lado derecho, R1, R2, R3 (región torácica) y R4, R5 (región abdominal) (Chandler, 1970) (figura 8).

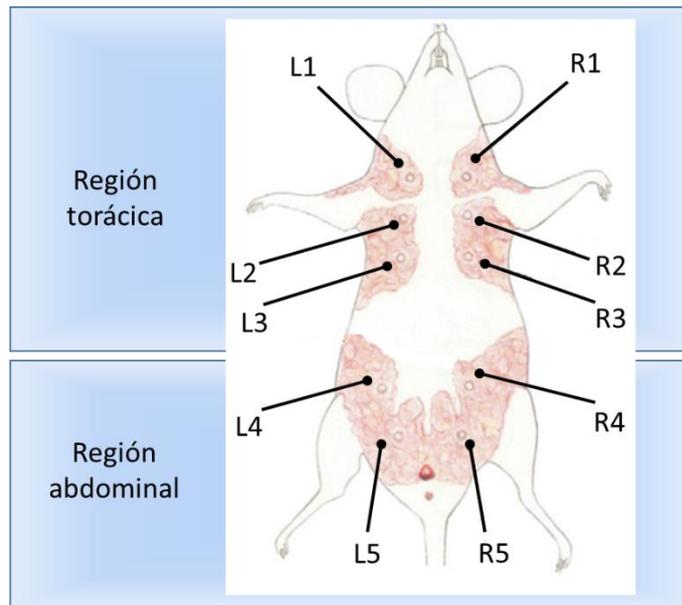


Figura 8: Esquema de ratón en posición decúbito dorsal donde se observa la disposición de las glándulas mamarias en la región torácica y abdominal (Fuente: Adaptado de Markiewicz *et al.*, 2015).

Los ratones se consideran un modelo adecuado para la investigación de la patogenia y control de las infecciones intramamarias bovinas porque, al igual que las vacas, tienen dos pares de glándulas mamarias en la región abdominal. En ambas especies, las glándulas son estructuras anatómica y funcionalmente independientes una de la otra, presentando cada glándula un conducto del pezón que se abre al exterior a través de un único orificio. El modelo murino de mastitis no solo proporciona un entorno único para el crecimiento de los patógenos y su interacción con el sistema inmune del hospedador, sino que además ofrece factores físicos como la succión durante la lactancia tal como ocurre en las vacas durante la lactancia o el ordeño (Notebaert y Meyer, 2006).

Otra ventaja que ofrece este modelo para el estudio de la mastitis es que las respuestas macroscópicas e histológicas en términos del daño en los tejidos y la infiltración de PMNs que se observan en las glándulas mamarias murinas, se asemejan estrechamente a lo que ocurre durante la mastitis bovina (Chandler, 1970).

HIPÓTESIS

El aceite esencial obtenido de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, estimula la respuesta inmune en animales desafiados con patógenos causantes de mastitis bovina permitiendo así su utilización como terapia alternativa en la prevención y/o control de la mastitis bovina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar *in vivo* la capacidad del aceite esencial obtenido de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, para estimular la respuesta inmune en animales desafiados con patógenos causantes de mastitis bovina, para su posible aplicación como terapia alternativa en la prevención y/o control de la enfermedad.

2.2. Objetivos específicos

1. Obtener el aceite esencial de *M. verticillata* (Griseb.) Epling (Lamiaceae), e identificar y cuantificar sus componentes puros por medio de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-MS).
2. Evaluar el efecto de la dosis del aceite esencial y el tiempo de exposición en células de la glándula mamaria *in vitro* e *in vivo*.
3. Caracterizar el efecto del aceite esencial sobre la fagocitosis en una línea de macrófagos murinos (RAW 264.7).
4. Evaluar el efecto de la dosis y tiempo de exposición de la cepa *E. faecium* EF214 mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras en período de lactancia.
5. Estudiar la glándula mamaria de ratones hembras en período de lactancia luego de:
 - ✓ Infectar la glándula mamaria con una suspensión de la cepa *E. faecium* EF214.
 - ✓ Pre-tratar la glándula mamaria con dos aplicaciones de aceite esencial.
 - ✓ Desafiar la glándula mamaria con la cepa *E. faecium* EF214 en ratones pre-tratados con aceite esencial.

5.1. Para ello se propuso:

- 5.1.1. Examinar macro e histopatológicamente las glándulas mamarias.
- 5.1.2. Realizar recuento bacteriano en homogenatos de glándula mamaria.
- 5.1.3. Determinar la presencia de bacterias en hígado, riñones y sangre.
- 5.1.4. Caracterizar molecularmente las cepas aisladas post-inoculación.
- 5.1.5. Evaluar la respuesta inmune innata, mediante el estudio de la expresión de los genes que codifican para el receptor TLR2 y las citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-

1 β), y anti-inflamatoria (IL-10) por PCR en Tiempo Real a distintos tiempos post-inoculación.

5.1.6. Determinar la producción de anticuerpos totales (IgM, IgG e IgA) en homogenatos de glándula mamaria y en suero de los ratones inoculados mediante ELISA indirecto.

5.1.7. Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺/CD69⁺ y CD8⁺/CD69⁺) por citometría de flujo.

3. MATERIALES

3.1. Drogas y reactivos

- ADN *Taq.* polimerasa (Promega).
- Agarosa 1,2% (Biodynamics): 1,2 g de agarosa en 100 ml de *Buffer* TBE 0,5X.
- Agua bidestilada.
- Anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos: anti-CD4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/anti-CD8 marcado con ficoeritrina (PE) (Thermo Fisher SCIENTIFIC).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD69 (H1.2F3), marcado con alofococianina (APC), eBioscience™, (Invitrogen, Thermo Fisher SCIENTIFIC).
- Anticuerpo secundario: Anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulinas G, A y M de ratón marcado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, USA).
- CTST™ GlutaMAX™-I Supplement (200-mM L-alanyl-L-glutamine dipeptide in 0,85% NaC) (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sintorgan®, Industria Argentina).
- *DNase I, RNase-free* (Thermo scientific).
- GelGreen™ (Biotium).
- Interferón- γ (IFN- γ) (Serotech).
- Ketamina 50 mg/ml (Vetanarcol® König).
- Kit “Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix with Low ROX” (Agilent Technologies, compatible con el equipo Agilent Mx3000P).
- Kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific).
- Lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Sigma-Aldrich).
- Marcador de peso molecular 100 pb (Promega).
- O-fenildiamina dihidrocloruro (OPD). Tabletas de 10 mg (Sigma, St. Louis, USA).
- RNase OUT Recombinant Ribonuclease inhibitor 40 U/ μ l (Invitrogen).
- Sal de tetramiltetrazolium (MTT, o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Invitrogen, Oregon, USA).
- Sonda no fluorescente de diclorofluoresceína 2,7', administrada en forma de diacetato (DCFH-DA) (Invitrogen NY, EE.UU).

- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) Cicarelli.
- Tripsina- EDTA (0,25% de tripsina (Difco) y 1 mM de EDTA (Sigma-Aldrich).
- TRIzol® (Life Technologies).
- Xilacina 1% (Rompun^{M.R.} Bayer).

3.2. Soluciones y colorantes

- *Buffer* carbonato (pH 10) (0,795 g de (Na_2CO_3) + 1,44 g (NaHCO_3). Agua destilada c.s.p. 500 ml. La solución se esteriliza en autoclave a $\frac{3}{4}$ atmósferas durante 30 min y se conservó a 4 °C hasta su uso.
- *Buffer* citrato-fosfato: preparar las siguientes soluciones:
 - Solución 1: 1,419 g de sodio fosfato dibásico (Na_2HPO_4) y diluirlo en 51,4 ml de agua deionizada.
 - Solución 2: 0,941 g de ácido cítrico y colocarlos en 48,6 ml de agua deionizada.

Para preparar 100 ml de *buffer* citrato-fosfato 0,05 M, pH 5, mezclar ambas soluciones. Esterilizar.

- *Buffer* FACS: (PBS 1X + SFB 1,5%).
- *Buffer* fosfato salino (PBS) pH 7,4.
- *Buffer* de lavado (Tween 20 al 0,05% en PBS).
- *Buffer* de lisis (8,29 g cloruro de amonio (NH_4Cl .) + 1 g bicarbonato ácido de potasio (KHCO_3) + 37 mg ácido etilendiamino tetraacético sal disódica (Na_2EDTA). Agua bidestilada c.s.p. 100 ml).
- *Buffer* de marcación (PBS: 98 ml, 0,1g de azida sódica, 1 ml de SFB, 1 ml de EDTA 0,5 M).
- *Buffer* TBE 5X (g/l): (54 g Tris base; 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5M (pH 8).
- *Buffer* TE 1X (10 mM Tris - EDTA1 mM; pH 7,5).
- Método rápido de coloración Panótico (Laborclin)
- Solución de Azul de Evans 0,2% en PBS.
- Solución de azul tripán 0,2% en PBS.
- Solución cromógena de *o*-fenildiamina dihidrocloruro (OPD) (10 mg de OPD en 25 ml de *buffer* citrato-fosfato 0,05 M con 10 μl de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%).

- Soluciones de Griess (solución A: sulfanilamida 1% y ácido ortofosfórico 5%; solución B: N-(1-naphthyl)-ethylendiamin 0,1%)
- Solución de Hanks sin suero y sin colorante (HBSS-Gibco)
- Solución de Paraformaldeído (SIGMA) al 4%.

3.3. Medios de cultivo

3.3.1. Medio completo DMEM (suplementado) para cultivo de células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T)

Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) con 3,7 g/l de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), insulina bovina (Betasint U-40/ml) 5 ug/mL, hidrocortisona (FADA PHARMA FRIDALIT 100, 100 mg) 1 µg/ml y CTST[™] GlutaMAX[™]-I Supplement (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 1/100. El medio se esterilizó por filtración, pH 7,2 - 7,4. Para la mantención de la línea celular el medio fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% (Natacor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Todos los ensayos fueron realizados con DMEM suplementado con SFB al 10%.

3.3.2. Medio completo DMEM (suplementado) para cultivo de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7

Medio DMEM con 3,7 g/l de NaHCO₃, gentamicina (10 mg/ml), HEPES (2,383 g/l), (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con aminoácidos no esenciales, L-glutamina, β-mercaptoetanol, piruvato de sodio (Gibco). Todas estas sustancias fueron agregadas en una concentración final de 10ml/l. El medio se esterilizó por filtración, pH 7,2 - 7,4.

Para la mantención de la línea celular el medio fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% (Gibco Laboratories, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA). Todos los ensayos fueron realizados con DMEM suplementado con SFB al 10%.

3.3.3. Medios de cultivo para cepas bacterianas

- **Caldo Tripticasa Soya (CTS)** (Britania, Argentina)

- **Agar Trypticase Soya (ATS)** (Britania, Argentina).

3.4. Material biológico

3.4.1. Cepas bacterianas

Los aislados bacterianos fueron identificados mediante métodos bacteriológicos convencionales y confirmados por secuenciamiento del RNA16S y por MALDITOF-MS. Las cepas utilizadas fueron: *S. uberis* SU07, *S. aureus* SA53, *E. faecium* EF214 y *E. coli* EC-1. Las cepas se conservaron a -20°C en CTS con la adición de glicerol al 20%.

3.4.2. Células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T)

Para realizar los ensayos de viabilidad celular *in vitro* se utilizó la línea celular MAC-T proveniente de células epiteliales mamarias alveolares bovinas transfectadas con SV-40 (Simian Virus 40). Las células MAC-T completan un ciclo de duplicación en aproximadamente 17 horas (Huynh *et al.*, 1991). Los ensayos con esta línea celular fueron realizados en Centro de Investigación y Transferencia de Villa María (Conicet-UNVM) bajo la dirección de la Dra. Carina Porporatto.

3.4.3. Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7

Para caracterizar el efecto *in vitro* del aceite esencial de *M. verticillata* sobre el proceso de fagocitosis se utilizó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 provenientes de macrófagos de ratones Balb/c transformados con el virus de la leucemia murina de Abelson (Raschke *et al.*, 1978). Los ensayos con esta línea celular se realizaron en el marco de una pasantía doctoral en la Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil (17 de agosto-17 de noviembre de 2015), bajo la dirección de la Dra. Débora Decote-Ricardo de Lima, Profesora del Laboratorio de Inmunología Veterinaria del Instituto de Microbiología e Inmunología Veterinaria.

3.4.4. Animales utilizados en los ensayos *in vivo*

Se utilizaron 116 ratones Balb/c hembras provistos por el Bioterio Central de la UNRC, de 6-8 semanas de edad, con peso aproximado de 30 g, y 10 a 15 días de lactancia. Los animales consumieron alimento y agua *ad-libitum*. Las experiencias con animales se

realizaron teniendo en cuenta la reglamentación internacional y nacional vigente y las normas institucionales del Comité de Ética de la Investigación Científica (CoEdI), UNRC, y aprobadas bajo el expediente 121/2015 CoEdI - UNRC.

3.4.5. Material vegetal

Hojas verdes y tallos delgados fueron recolectados de la especie *Minthostachys verticillata* proveniente de la localidad de Santa Rosa, provincia de Córdoba, Argentina en abril de 2013. Durante la colecta de la especie vegetal se seleccionaron aquellos especímenes que evidenciaron aspectos macroscópicos normales, sin presencia visible de patógenos que alteraran su fisiología. Fueron respetadas las indicaciones y normas sugeridas por la OMS, recolectándose las partes aéreas del vegetal, sin comprometer las raíces de la especie para contribuir con su preservación ecológica. Teniendo en cuenta que *M. verticillata* sufre tala indiscriminada en las sierras de Córdoba producto de su comercialización; y que como consecuencia de esto es una especie vegetal en peligro de extinción, se decidió trabajar también con un espécimen de *M. verticillata* proveniente de la localidad de Villa Larca provincia de San Luis, el cual fue adquirido en abril de 2013 en un local comercial. Las plantas fueron identificadas y clasificadas taxonómicamente por la Dra. Margarita Grosso del área de Botánica de la UNRC, Córdoba, Argentina y un ejemplar de la muestra se almacenó en el herbario RCV (Río Cuarto Vasculares) como archivo #1955.

El material vegetal seco y conservado a temperatura ambiente en una bolsa de papel madera fue utilizado inmediatamente después de su colecta para proceder luego a la obtención del aceite esencial.

4. MÉTODOS

4.1. Obtención del aceite esencial de *M. verticillata*

Para la obtención del AE, se utilizaron dos especímenes de la especie *M. verticillata*, uno proveniente de la localidad de Santa Rosa, provincia de Córdoba, y el otro proveniente de la localidad de Villa Larca provincia de San Luis Argentina. Sesenta g del material vegetal fueron sometidos a un proceso de hidrodestilación durante 1 h utilizando un aparato tipo Clevenger modificado (**figura 9**). Para ello, el material vegetal se colocó en una columna extractora. En un balón de 1 litro de capacidad, conteniendo agua, se generó calor hasta ebullición; los vapores de agua al atravesar el lecho vegetal en la columna, arrastraron los componentes volátiles, los cuales condensaron en el refrigerante, obteniéndose un líquido que luego por decantación, se separó en dos fases, una oleosa y otra acuosa. El agua emulsionada dentro del aceite fue extraída por precipitación mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). La fracción de AE fue conservada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y al resguardo de la luz hasta su uso (De Feo *et al.*, 1998; Senatore, 1998).



Figura 9: Equipo de hidrodestilación para la obtención de aceites esenciales

4.1.1. Identificación y cuantificación de los componentes principales del aceite esencial de *M. verticillata*

El AE fue analizado utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-MS) para identificar y determinar el porcentaje relativo de los compuestos principales en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-Conicet), Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Para realizar este análisis se utilizó un cromatógrafo de gases *Clarus 600*, Perkin Elmer N° de serie 664N9100105, equipado con una columna DB5 (60 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm de partícula). Gas Carrier: Helio (49,6 psi). Programa de temperatura del horno: temperatura inicial 60 °C (2 min), rampa: 5 °C/min, temperatura final 240 °C (10 min), temperatura del inyector 300 °C. La muestra se inyectó en modo de inyección Split (20 ml/min). El cromatograma fue obtenido en modo “scan”, desde $m/z = 30$ a $m/z = 450$ (scan time: 0,2 s, inter-scan time: 0,1s), solvent delay: 5 min.). La identificación de los compuestos presentes en la muestra de AE, se realizó por comparación de los tiempos de retención y de los espectros de masas utilizando la biblioteca del programa NIST MS Search 2.0. En las mismas condiciones cromatográficas de la muestra, fueron inyectados además, los compuestos puros (grado *standard*) para corroborar la identidad de los componentes principales presentes en la muestra. El cálculo del porcentaje relativo de cada compuesto presente en la muestra de aceite se calculó en función del área de cada pico del cromatograma (Zygodlo *et al.*, 1996; Cariddi *et al.*, 2009a).

Mediante esta técnica se pudo determinar que los compuestos mayoritarios del AE de la especie *M. verticillata* proveniente de la localidad Santa Rosa (Córdoba) fueron pulegona (29,58%) mentona (60,57%) (**tabla 1 y figura 1, anexo I**). Sin embargo, el quimiotipo resultó diferente al informado por Cariddi *et al.* (2011b), quienes demostraron el efecto inmunoestimulante del AE sobre células T y B humanas. Sobre la base de estos resultados, los diferentes ensayos de esta Tesis se realizaron con el AE de *M. verticillata* proveniente de la provincia de San Luis.

4.2. Ensayos *in vitro*

4.2.1. Preparación del aceite esencial de *M. verticillata*

Para llevar a cabo los ensayos *in vitro* se preparó una solución stock del AE ($\delta=0,92$ g/ml) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (1:2) y luego en PBS (1:10). A partir de esta solución se realizó una dilución 1:100 en medio DMEM completo. Esta última es la que se utilizó para preparar las diferentes concentraciones de AE que se utilizaron en los ensayos *in vitro*.

4.2.2. Ensayo de viabilidad celular en una línea de células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T)

Para realizar este ensayo se trabajó con la línea de células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T). Se colocaron 5×10^4 células/pocillo en una microplaca estéril de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo DMEM completo y se incubaron durante 24 h a 37 °C, con 5% de CO₂ y humedad para permitir la formación de una monocapa confluyente en la base de los pocillos. Posteriormente, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del AE de *M. verticillata* e incubadas a distintos tiempos para evaluar el efecto sobre la viabilidad celular.

Las diferentes concentraciones de AE que se ensayaron (10, 25, 50, 100, 250 y 500 μ g/ml) se eligieron sobre la base de el estudio previo realizado por Cariddi *et al.* (2011b). Como control se utilizaron células MAC-T a las que se le agregó medio DMEM completo solo, y como control de vehículo se agregó DMSO (0,05%) en DMEM completo. Las células fueron incubadas a diferentes tiempos (6, 12, 24 y 48 h) a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se descartó el medio de cultivo y la viabilidad celular fue evaluada por el método colorimétrico de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) según lo descrito por Mosmann (1983) con modificaciones.

Para ello, se agregó en cada pocillo 90 μ l de medio DMEM sin suplementar y 10 μ l de la solución de MTT (5 mg/ml de MTT en PBS pH 7,4). La placa se incubó a 37 °C con 5% CO₂ por 4 h. Luego, se agregaron 100 μ l de DMSO por pocillo para disolver los cristales de formazán que resultaron de la conversión del MTT. Finalmente, el resultado fue analizado colorimétricamente mediante la lectura de la DO a una longitud de onda $\lambda = 570$ nm, en un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

El fundamento de esta técnica se basa en la reducción metabólica del MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

4.2.3. Efecto del aceite esencial de *M. verticillata* sobre la fagocitosis en una línea de macrófagos murinos (RAW 264.7)

4.2.3.1. Ensayo de proliferación

Se colocaron 2×10^5 células/pocillo en una microplaca estéril de 24 pocillos en un volumen final de 500 μ l de medio de cultivo DMEM completo y se incubaron a 37 °C, con 5% de CO₂ y humedad durante 2 h para permitir la adhesión celular a la base de los pocillos. Posteriormente, las células fueron expuestas a una única concentración de AE (50 μ g/ml) teniendo en cuenta resultados previos (Cariddi *et al.*, 2011b) y DMSO 0,05% en DMEM completo (control vehículo). Luego de 24 y 48 h post-incubación las células fueron lavadas, tripsinizadas y se realizó una dilución 1:2 con azul tripán para proceder al recuento utilizando cámara de Neubauer.

4.2.3.2. Evaluación de adherencia de células RAW 264.7

Se colocaron 2×10^5 células/pocillo en una microplaca estéril de 24 pocillos en un volumen final de 500 μ l de medio de cultivo DMEM completo. Inmediatamente las células fueron expuestas a una única concentración de AE (50 μ g/ml) y DMSO 0,05% en DMEM completo (control vehículo). El sistema fue incubado a 37 °C, con 5% de CO₂ y humedad durante 1 h, para evaluar si el AE interfería con la adhesión celular a la base de los pocillos. Finalizado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas, tripsinizadas y contadas utilizando cámara de Neubauer.

4.2.3.3. Ensayo de adherencia y fagocitosis de células RAW 264.7

Para realizar este ensayo se colocaron 1×10^5 células/pocillo en una microplaca estéril de 24 pocillos en un volumen final de 500 μ l de medio de cultivo DMEM completo y se

incubaron a 37 °C, con 5% de CO₂ y humedad durante 2 h para permitir la adhesión celular al cubreobjetos de vidrio colocado en la base de los pocillos. Posteriormente, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del AE (0; 0,5; 5; 50; 60 y 75 µg/ml) e incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 h para evaluar el efecto sobre la adherencia y fagocitosis. Estas concentraciones se eligieron sobre la base de un estudio previo realizado por Cariddi *et al.* (2011b). Como control se utilizaron células a las que se le agregó medio DMEM completo solo, y como control de vehículo se agregó DMSO (0,05%) en DMEM completo.

Después del periodo de incubación, una cantidad de 2 mg de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico seco instantáneo- Saf-instant) fueron homogeneizados en 50 ml de medio DMEM completo. Luego de una completa solubilización de las levaduras, se realizó el recuento en cámara de Neubauer para poder adicionarlas a cada uno de los pocillos en una proporción 10:1. Posteriormente, el sistema fue incubado a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 10 min (para el ensayo de adherencia) y 4 h (para el ensayo de fagocitosis). Finalizados los periodos de incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar las levaduras que no fueron adheridas ni fagocitadas. Los cubreobjetos fueron teñidos con el método rápido Panótico (Laborclin). Luego de la coloración y el montaje de los cubreobjetos en portaobjetos, las células fueron contadas en un microscopio óptico con un aumento de 100X para determinar el porcentaje de macrófagos que adhirieron o fagocitaron levaduras y también el número de levaduras adheridas o fagocitadas por estas células. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

4.2.3.4. Evaluación de la viabilidad de levaduras luego de la fagocitosis por las células RAW 264.7

Se colocaron 1×10^5 células/pocillo en una microplaca estéril de 24 pocillos en un volumen final de 500 µl de medio de cultivo DMEM completo y se incubaron a 37 °C, con 5% de CO₂ y humedad durante 2 h para permitir adhesión celular en la base de los pocillos. Posteriormente, las células fueron expuestas a una única concentración de AE (50 µg/ml) de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de adherencia y fagocitosis que se describen más adelante (punto 5.2.2.3. de la sección resultados y discusión). Como control se utilizaron células a las que se le agregó medio DMEM completo solo, y como control de vehículo se

agregó DMSO (0,05%) en DMEM completo. Las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, durante 24 h.

Finalizado el tiempo de incubación, se adicionó la levadura *S. cerevisiae* en proporción 10:1 y el sistema fue incubado durante 4 h a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Posteriormente, los macrófagos fueron lavados dos veces con PBS para eliminar las levaduras que no fueron fagocitadas y luego fueron lisados con 500 µl de agua helada. El lisado fue diluido en una proporción 1:100 en PBS. Un volumen de 30 µl fue sembrado en placas de Petri con agar Sabouraud. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 72 h. Luego de ese periodo, se determinó el número de unidades formadoras de colonias. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

4.2.3.5. Dosaje de óxido nítrico (NO)

La producción de óxido nítrico por parte de las células RAW 264.7 tratadas con AE, fue evaluada indirectamente por la presencia de nitrito en el sobrenadante de cultivo de las células, utilizando el método de Griess según Sun *et al.* (2014) con modificaciones. Las células fueron colocadas (1x10⁵ células/pocillo) en una microplaca estéril de 24 pocillos en medio de cultivo DMEM completo, el volumen final fue 500 µl, e incubadas a 37 °C, con 5% de CO₂ y humedad durante 2 h, para permitir la adhesión celular en la base de los pocillos. Posteriormente las células fueron tratadas y estimuladas como se detalla a continuación:

- Control: células + medio DMEM completo.
- LPS (200 ng/ml) e INF- γ (2 ng/ml).
- AE (50 µg/ml).
- LPS (200 ng/ml) e INF- γ (2 ng/ml) durante 24 hs y posterior adición de AE 50 µg/ml).
- AE (50 µg/ml) durante 24 hs y posterior estímulo con LPS (200 ng/ml) e INF- γ (2 ng/ml).
- AE 50 µg/ml + LPS (200 ng/ml) + INF- γ (2 ng/ml).

Se utilizó una única concentración de AE, según lo detallado en el punto anterior (4.2.3.4). Las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 30, 60, 120, 180 y 240 min. Finalizado los tiempos de incubación, se tomaron 50 µl de sobrenadante de cada pocillo y se colocaron en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Un

volumen de 50 μl de las dos soluciones de Griess en proporción 1:1 fue adicionado al sobrenadante previamente recogido y a los pocillos que contenían las diluciones seriadas en base 2, a partir de una concentración de 100 μM de nitrito de sodio. Finalmente, la DO se leyó a una $\lambda = 540 \text{ nm}$ en un lector de microplacas (SpectraMax® M3 Multi-Mode Microplate Reader). Con los datos obtenidos, se construyó la curva de calibración, a partir de esta se calculó la concentración de NO en el sobrenadante de las células RAW 264.7.

El fundamento de esta técnica se basa en la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido para formar una sal diazonio la cual, acoplada a aminas aromáticas como N-1-(naftil) etilendiamin, produce un compuesto de color rosado. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

4.2.3.6. Dosaje de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Para evaluar la capacidad de las células RAW 264.7 para producir ROS en presencia de AE, se utilizó la sonda no fluorescente diclorofluoresceína 2,7', administrada en forma de diacetato (DCFH-DA). Esta sonda DCFH-DA en presencia de ROS, se convierte en producto fluorescente (2,7'-diclorofluoresceína). Los niveles intracelulares de ROS se midieron mediante la detección de la intensidad de fluorescencia según lo descrito por Mendonça *et al.* (2017) con modificaciones. Para ello, las células fueron colocadas ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo) en una microplaca estéril de 96 pocillos de fondo claro y laterales oscuros (Costar 3603-Corning) en un volumen final de 200 μl de medio de cultivo DMEM completo e incubadas a 37 °C, con 5% de CO₂ y humedad durante 2 h para permitir adhesión celular en la base de los pocillos. Posteriormente las células fueron tratadas y estimuladas como se detalló en el punto anterior (4.2.3.5).

Luego de 24 h de incubación, las células fueron lavadas una vez con solución de Hanks sin suero y sin colorante y se incubaron con la sonda DCFH-DA (10 μM /pocillo en un volumen final de 100 μl) en estufa (37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂), durante 20 min, para permitir el ingreso de la sonda al citoplasma celular. Luego, las células fueron lavadas dos veces con Hanks y se adicionó AE (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LPS (200 ng/ml) e INF- γ (2 ng/ml) en los pocillos correspondientes tal cual como se detalló anteriormente. La placa fue incubada a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 min. Finalmente, la fluorescencia se midió en un lector de microplacas (SpectraMax® M3 Multi-Mode Microplate Reader) a una λ de emisión de 530 nm y una λ de excitación de 485 nm.

Esta técnica se fundamenta en que la sonda DCFH-DA, en su forma reducida no emite fluorescencia, ingresa a la célula y por acción de las esterasas intracelulares pierde sus grupos acetatos transformándose en una molécula que es retenida por la célula, la cual en presencia de ROS, se oxida y emite fluorescencia. Utilizando un fluorímetro puede realizarse el dosaje de ROS. A mayores niveles de ROS intracelular, mayor será la fluorescencia emitida. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

4.3. Ensayos *in vivo*

Para los ensayos *in vivo*, se realizó el seguimiento de los ratones Balb/c hembras durante el periodo de apareamiento, gestación y parto (**figura 1, anexo II**). Esto fue fundamental comprender el comportamiento de esta especie. Para cada hembra, el día del parto fue registrado como el primer día de lactancia y se marcaron en la nuca o en la cola con un hisopo embebido en fucsina (**figura 2, anexo II**). Benavides y Guénet (2003) informaron que en general, los ratones paren entre 4 y 8 crías, pero en el laboratorio, pueden dar a luz sólo un par de crías. El seguimiento realizado mostro que luego del periodo de gestación, cada hembra dio a luz entre 6 a 14 crías ocupándose meticulosamente de cada una de ellas hasta el destete. Además, fue posible percibir el instinto materno de las hembras, a tal punto que les permite ocuparse tanto de sus propias crías como de las ajenas y de esta forma pueden transformarse en madres sustitutas (**figura 3, anexo II**). Esta especie es de fácil manipulación y luego de unos días de reconocimiento entre el animal y el operario, se logra la sujeción de los mismos sin problemas.

4.3.1. Optimización de la inoculación intramamaria en un modelo murino

Para realizar este ensayo, se siguió el protocolo descrito por Chandler (1970) con modificaciones. Se utilizaron ratones Balb/c hembras en período de lactancia (10 a 15 días). Las crías fueron separadas de sus madres 2 h antes de la IIM, quedando con madres sustitutas (Trigo *et al.*, 2009).

Luego de registrar su peso corporal, los animales fueron ligeramente anestesiados con 87/13 mg/kg de ketamina/xilacina, respectivamente, para aliviar el dolor producido en la IIM (Brouillette *et.al*, 2004) (**figura 10**).



Figura 10: Anestesia de los ratones Balb/c hembras por vía intraperitoneal.

Para realizar las IIM los animales se colocaron en posición decúbito dorsal. La zona de las glándulas mamarias abdominales se desinfectó empleando algodón y alcohol, se expusieron los pezones, sin rasurar para evitar lastimar. Se utilizaron pinzas estériles para sujetar delicadamente el pezón y posicionarlo para la inoculación (**figura 11**).

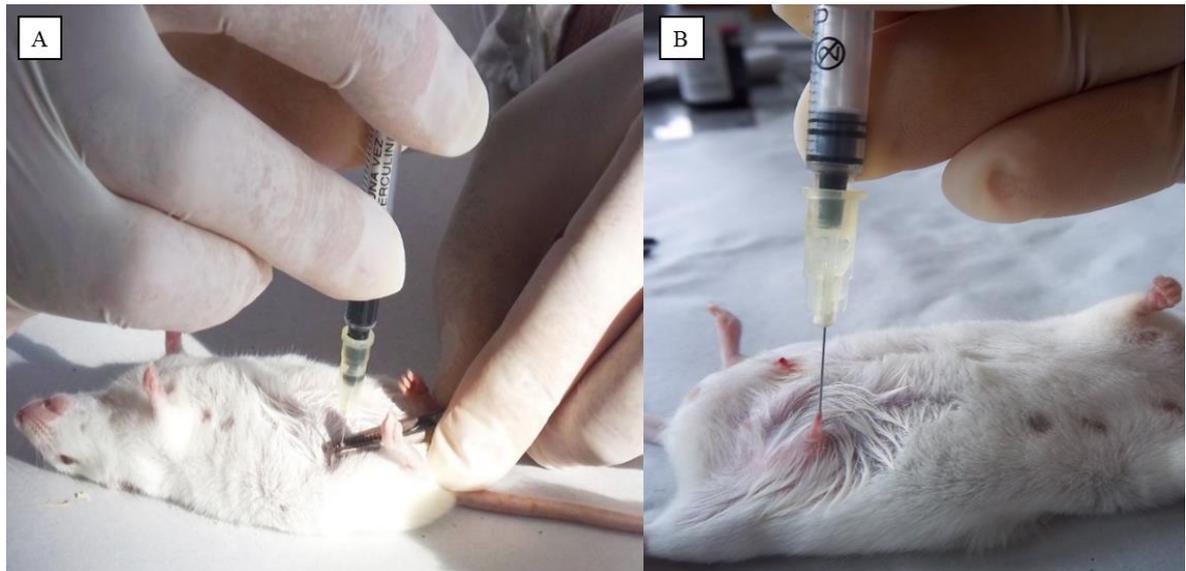


Figura 11: **A)** Sujeción del pezón con pinzas para lograr la inoculación intramamaria. **B)** Inoculación intramamaria. Se observa la aguja (30G) en el canal del pezón del ratón Balb/c hembra.

Se emplearon agujas 30G montadas en jeringas descartables de plástico de 1 ml para la inoculación. Por ser de mayor tamaño, se seleccionaron las glándulas mamarias abdominales derecha e izquierda (R4 y L4) así resultan más fáciles de observar y extirpar (Brouillette y Malouin, 2005).

La puesta a punto de la técnica de IIM requirió de la realización de diferentes determinaciones:

a) Para evaluar el éxito de las IIM e identificar la división anatómica exacta entre las glándulas, se siguió el protocolo descrito por Krause *et al.* (2013), con modificaciones. De acuerdo a lo descrito anteriormente se inocularon 20 μ l de una solución de colorante Azul de Evans (0,2%), a través del canal del pezón. Para ello, se utilizaron 2 ratones y se seleccionaron las glándulas L4 y R5 de la región abdominal (**figura 12**).

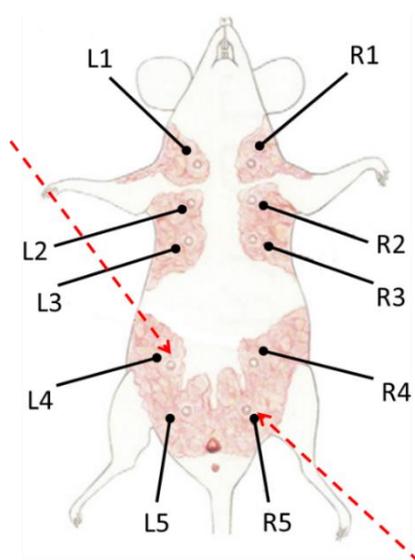


Figura 12: Disposición de las glándulas mamarias en el ratón. Se señalan las glándulas mamarias (L4 y R5) que se inocularon con Azul de Evans al 0,2%.

Inmediatamente después de la inoculación, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Las glándulas mamarias fueron extirpadas y colocadas sobre portaobjetos para ser observadas.

Gracias al esquema de inoculación explicado anteriormente, se logró identificar el lugar exacto de división anatómica entre las glándulas mamarias debido a que el colorante luego de la inoculación permaneció en las glándulas L4 y R5 y no difundió hacia las glándulas vecinas L5 y R4, respectivamente (**figura 4, anexo II**), confirmando esta manera que las inoculaciones intramamarias se estaban realizando correctamente. Por otro lado, se pudo

evidenciar que cada glándula mamaria es anatómica y funcionalmente independiente de la glándula vecina (Chandler, 1970; Brouillette *et al.*, 2004).

b) Para determinar diferencias en las glándulas mamarias después de la IIM, el ensayo se realizó de dos maneras:

Regresando las hembras con sus crías para continuar con la lactancia, según Trigo *et al.* (2009).

No regresando las hembras con sus crías según Chandler (1970) y Brouillette *et al.* (2004).

Para ello 4 animales fueron divididos en 2 grupos de 2 animales cada uno según se detalla a continuación:

- ✓ Grupo 1: Recibieron por IIM 100 µl de PBS y volvieron con sus crías.
- ✓ Grupo 2: Recibieron por IIM 100 µl de PBS y no volvieron con sus crías.

Después de realizar la observación clínica, los animales de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical a las 72 h post-inoculación, para su examinación macroscópica post-mortem e histopatológica. Las glándulas mamarias de las hembras que continuaron y discontinuaron con la lactancia no presentaron ninguna alteración macroscópica (**figura 5, anexo II**). Sin embargo, en las hembras que no volvieron con sus crías se observó, un incremento esperable en la secreción láctea y la presencia de 2 a 3 PMNs por alveolo, una inflamación fisiológica generada por el cese de la lactancia (**figuras 5 B y 6 B, anexo II**). Por otro lado, el análisis histopatológico de las glándulas mamarias de las hembras que continuaron con la lactancia reveló que las mismas presentaban poca secreción láctea y no se observó infiltración de PMNs (**figura 6 A, anexo II**).

Teniendo en cuenta estos resultados los ensayos *in vivo* se realizaron regresando las hembras con sus crías, para evitar la inflamación de las glándulas mamarias generada por la falta de lactancia

4.3.2. Efecto de la dosis y tiempo de exposición del aceite esencial de *M. verticillata* mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras

Se evaluó el efecto de la dosis y tiempo de exposición del mismo en las glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10 a 15 días de lactancia, con el objetivo de encontrar las dosis óptimas de AE que no resulten tóxicas para la glándula mamaria y así

poder caracterizar su potencial inmunomodulador y posible aplicación en infecciones intramamarias.

Para realizar este ensayo con el AE se preparó una solución stock del AE ($\delta=0,92$ g/ml) disuelto en DMSO (1:2) y luego en PBS (1:10). A partir de esta solución se realizó una dilución 1:100 en PBS. Esta última solución es la que se utilizó para preparar, las diferentes concentraciones de AE (25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) que se ensayaron *in vivo*.

La IIM del AE se realizó siguiendo el protocolo descrito en el punto anterior (4.3.1).

Se utilizaron 24 ratones Balb/c hembras en período de lactancia (10 a 15 días) que fueron divididos en 4 grupos de 6 animales cada uno (2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio) como se describe a continuación:

- ✓ Grupo 1: control vehículo (recibieron por IIM 100 μl de PBS/DMSO 0,05%).
- ✓ Grupo 2-4: recibieron por IIM 100 μl de AE (25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente.

Las hembras volvieron con sus crías luego de las IIM. Para ello, se esperaron 8 h post-inoculación para permitir la difusión del AE en la glándula.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a las 24, 48 y 72 h post-inoculación. Las glándulas mamarias de todos los grupos fueron extirpadas para su examinación macroscópica post-mortem y realizar procedimientos histológicos de rutina.

4.3.2.1. Evaluación de la dosis inmunoestimulante del aceite esencial de *M. verticillata* en glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras

Para seleccionar una dosis inmunoestimulante de AE, se realizó una IIM (dos ratones por dosis de AE) con 100 μl de AE (25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Setenta y dos horas después recibieron un *booster* de 100 μl de las mismas concentraciones (Tavares *et al.*, 1995). Los ratones fueron sacrificados 24 h post-inoculación y las glándulas mamarias fueron extirpadas de manera aséptica para realizar el análisis histopatológico y detección de PMNs.

4.3.3. Efecto de la dosis y tiempo de exposición de la cepa *E. faecium* EF214 mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras

Con el objetivo de desarrollar un modelo murino de mastitis caracterizado a nivel histopatológico por la presencia de células inflamatorias en la glándula mamaria se realizaron ensayos con una cepa de *S. uberis* SU07 aislada de mastitis bovina. Los resultados

obtenidos mostraron que con las concentraciones utilizadas de esta cepa (1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 UFC/ml) no se logró la inflamación intramamaria en ratones Balb/c hembras característica de una mastitis (Montironi *et.al*, 2016c). Considerando estos resultados y que cualquier patógeno serviría como herramienta necesaria para lograr una respuesta inflamatoria en ratones, se realizaron nuevos ensayos con otros patógenos productores de mastitis. Se emplearon cepas de *S. aureus*, *E. faecium* y *E. coli*, las cuales fueron aisladas en nuestro laboratorio y posteriormente identificadas mediante métodos bacteriológicos convencionales y confirmados por secuenciamiento del RNA16S y por MALDITOF-MS.

Luego de realizar el análisis histopatológico de las muestras de glándulas mamarias inoculadas con las cepas *S. aureus* (1×10^5 UFC/ml) y *E. coli* (1×10^9 UFC/ml) se observó que ninguno de estos patógenos en las concentraciones empleadas logró inducir mastitis. Sin embargo, una de las suspensiones ensayadas con *E. faecium* fue capaz de inducir el reclutamiento de PMNs hacia la glándula mamaria para iniciar la respuesta inflamatoria característica de esta enfermedad. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente a continuación, se describen los ensayos realizados empleando la cepa *E. faecium* denominada EF214.

Para realizar este ensayo, se preparó un cultivo overnight (O/N) de la cepa EF214 en CTS el cual fue centrifugado, lavado dos veces con PBS y finalmente resuspendido en PBS.

Sobre la base de los datos de una curva de crecimiento (Tiempo vs DO y UFC/ml) de la cepa EF214 (**figura 1, anexo III**), el inóculo fue diluido en base 10 para obtener los diferentes inóculos ensayados (Trigo *et al.*, 2009).

La IIM de las diferentes concentraciones de la cepa EF214 se realizó siguiendo el protocolo estandarizado previamente

Luego de las IIM, para permitir la difusión del inóculo en la glándula, transcurridas 8 h post-inoculación las hembras se colocaron con sus crías.

Se utilizaron 40 ratones Balb/c hembras en período de lactancia (10 a 15 días) que fueron divididos en 5 grupos de 8 animales cada uno (2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio) como se describe a continuación:

- ✓ Grupo 1: control vehículo (recibieron por IIM 100 μ l de PBS/DMSO 0,05%).
- ✓ Grupo 2-5: recibieron por IIM 100 μ l de una suspensión de la cepa EF214 con distintas concentraciones (1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 y 1×10^8 UFC/ml), respectivamente.

Posteriormente los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación. Las glándulas mamarias de todos los grupos fueron extirpadas para su examinación macroscópica post-mortem, procesadas para determinar recuento

bacteriano y realizar procedimientos histológicos de rutina. Se evaluó la diseminación del microorganismo luego de la IIM en distintos órganos como hígado, riñones y sangre. Además, se realizó una caracterización molecular de las cepas aisladas de las glándulas mamarias y de cada órgano por RAPD-PCR, para comparar las cepas recuperadas con la cepa inoculada.

La metodología de los ensayos mencionados anteriormente se describe a partir del punto 4.3.5 de esta sección

4.3.4. Evaluación del efecto inmunomodulador del aceite esencial de *M. verticillata* en un modelo murino de mastitis

Durante la optimización de las IIM se estableció que los ratones Balb/c hembras luego de 8 h post-inoculación continuarían con la lactancia. Posteriormente se demostró *in vivo* la inocuidad de diferentes concentraciones de AE y se definió que AE (100 µg/ml) presentó actividad inmunoestimulante (descrito en los puntos 5.3.1.2 y 5.3.1.3, respectivamente, de la sección resultados y discusión). Por otro lado se logró el desarrollo de un modelo murino de mastitis por la cepa *E. faecium* EF214 (1×10^8 UFC/ml) (descrito en punto 5.3.2 de la sección resultados y discusión). Finalizadas todas estas etapas de la optimización se planteó el diseño experimental que se describe a continuación para lograr caracterizar el potencial inmunomodulador del AE en un modelo de infección intramamaria.

La preparación del AE (100 µg/ml) y del inóculo (*E. faecium* EF214 1×10^8 UFC/ml) se realizó según lo descrito en los puntos 4.3.2 y 4.3.3, respectivamente.

La IIM de las diferentes suspensiones se realizó siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.3.1.

Se utilizaron 40 ratones Balb/c hembras en período de lactancia (10 a 15 días) que fueron divididos en 4 grupos de 10 animales cada uno (2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio) como se describe a continuación:

- ✓ Grupo 1: control vehículo (recibieron por IIM 100 µl de PBS/DMSO 0,05%).
- ✓ Grupo 2: recibieron por IIM 100 µl de una suspensión de la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml).
- ✓ Grupo 3: pre-tratamiento con AE (recibieron por IIM 100 µl de una suspensión de AE (100 µg/ml) y 72 h después recibieron por IIM un *booster* de 100 µl de la misma suspensión de AE (100 µg/ml)).

- ✓ Grupo 4: desafío (recibieron el pre-tratamiento con AE (según lo detallado para el grupo 3) y 24 h después del *booster* de AE, recibieron por IIM 100 µl de una suspensión de la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml).

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a las 24, 48, 72, 96 y se ensayó un tiempo más, 360 h (15 días) post-inoculación. Las glándulas mamarias de todos los grupos fueron extirpadas para su examinación macroscópica post-mortem, procesadas para realizar procedimientos histológicos de rutina, determinar recuento bacteriano y analizar la expresión del receptor TLR2 y citoquinas (TNF- α , IL1- β e IL10) por PCR en Tiempo Real.

Además, se evaluó la presencia de bacterias en hígado, riñones y sangre para determinar la posible diseminación del microorganismo luego de la IIM.

Se realizó la cuantificación de los niveles de anticuerpos totales (IgM, IgG e IgA) específicos para la cepa EF214 por ELISA indirecto, en los homogenatos de glándula mamaria y en suero de los animales de los grupos control vehículo, cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) y desafío a las 360 h (15 días) post-inoculación. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca, se centrifugaron a 600 rpm durante 5 min, y los sueros fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

Para cuantificar las subpoblaciones de LT (CD4⁺/CD69⁺, y CD8⁺/CD69⁺) mediante citometría de flujo, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca con jeringa heparinizada a las 96 h post-inoculación, de los grupos control vehículo, cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratamiento con AE y desafío.

La metodología de los ensayos mencionados anteriormente se describe a continuación.

4.3.5. Examinación clínica

Durante el desarrollo de todos los ensayos *in vivo* los ratones inoculados fueron examinados diariamente con el fin de observar reacciones locales como oscurecimiento de la piel en la base de los pezones, inflamación y enrojecimiento de las glándulas mamarias y reacciones generalizadas como pelos erizados, debilidad y aspecto encorvado.

4.3.6. Examinación macroscópica post-mortem

Las glándulas mamarias de todos los animales inoculados en los distintos grupos, se extirparon de manera aséptica y se examinaron con el fin de observar hinchazón, decoloración, exudación o formación de abscesos. Se comparó con el grupo control.

4.3.7. Examinación histopatológica

Se realizó con el fin de investigar alteraciones histopatológicas en la estructura del tejido mamario (arquitectura de la glándula mamaria, infiltración de PMNs, daño epitelial). Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se tomaron muestras de tejidos de glándula mamaria y se procesaron según procedimientos histológicos de rutina. Brevemente, las glándulas fueron fijadas en formaldehído al 4% en PBS y embebidas en parafina. Se tomaron secciones de 5 μm que fueron teñidas con hematoxilina/eosina (H/E) y analizadas posteriormente (Chinchali y Kaliwal, 2014)

4.3.8. Recuento bacteriano a partir de homogenatos de glándula mamaria

Las glándulas mamarias de los ratones inoculados con las diferentes concentraciones de la cepa EF214 (1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 y 1×10^8 UFC/ml) y de los ratones del grupo desafío a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h), fueron extirpadas y procesadas de manera aséptica para determinar las UFC/ml. Para ello, cada glándula mamaria fue homogeneizada en 1 ml de PBS para obtener un homogenato. A partir de los homogenatos se realizaron diluciones seriadas en base 10. Posteriormente, se determinaron las UFC/ml utilizando el método de la microgota descrito por Miles *et al.* (1938), con modificaciones. Para ello, se sembraron 3 gotas de 20 μl por dilución en un cuarto de placa con ATS. Luego se incubó a 37 °C durante 24 h y el factor de dilución correspondió a aquella dilución en la cual se contaron entre 3 y 30 colonias por gota.

4.3.9. Recuperación de bacterias de hígado, riñones y sangre

Con el fin de evaluar la diseminación del microorganismo hacia otros órganos, se extirparon de manera aséptica el hígado y los riñones de los ratones inoculados con las diferentes concentraciones de la cepa EF214 (1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 y 1×10^8 UFC/ml) y de los ratones del grupo desafío a diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 y 360 h (15 días)). Se realizaron improntas de estos órganos en placas con ATS. También se obtuvieron muestras de sangre

por punción cardíaca con jeringa heparinizada que fueron diseminadas en placas con ATS. Las placas de ATS fueron incubadas a 37 °C durante 24 h para determinar la presencia de bacterias en órganos y sangre.

4.3.10. Caracterización molecular de las cepas aisladas post- inoculación

Se realizó la caracterización molecular por RAPD-PCR para determinar el perfil genético de las bacterias recuperadas de glándula mamaria y de los distintos órganos de los ratones inoculados con la cepa EF214.

Para ello, se extrajo el ADN cromosomal de las cepas aisladas según Reinoso *et al.* (2004a). El ADN fue purificado por precipitación con etanol 100%. El ADN resultante fue resuspendido en 30 µl de *buffer* TE 1X. Las muestras de ADN fueron conservados a -20°C.

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 µl de *buffer* que contenía: ADN molde (25 ng), 3 µM del *primer* OLP13 (5'-ACCGCCTGCT-3'), 200 µM de cada dNTPs, 3,5 mM MgCl₂, y 2,5 U de ADN *Taq* polimerasa. Las reacciones se realizaron en un termociclador PTC 220 MJ Research siguiendo el siguiente programa durante 40 ciclos: desnaturalización: 94 °C por 5 min, hibridación: 37 °C por 1,30 min y extensión: 72 °C por 1,30 min. Un paso final de extensión a 72 °C por 8 min fue incluido en todas las amplificaciones.

Las reacciones se realizaron por duplicado y se incluyó un control positivo (cepa EF214) y uno negativo (agua) en cada reacción.

Los productos de RAPD-PCR junto a un marcador de peso molecular (100pb) se resolvieron en gel de agarosa al 1,2% en *buffer* TBE (0,5X), teñido con GelGreen™. La corrida se llevó a cabo a voltaje constante (70 V) durante 1,5 h. Los geles se visualizaron bajo luz UV con digitalizador MiniBisPRO.

4.3.11. Extracción de ARN total de glándula mamaria murina

El ARN total de las glándulas mamarias R4 y L4 de los ratones de los grupos control vehículo, cepa EF214 (1x10⁸ UFC/ml), pre-tratados con AE (100 µg/ml) y desafío (pre-tratamiento con AE y desafío con la cepa EF214), fue extraído utilizando TRIzol® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalizada la extracción se realizó un tratamiento con DNasa empleando *DNase I*, *RNase-free*. El ARN total fue cuantificado por espectrofotometría midiendo la DO a 260 y 280 nm. La relación de DO a 260 nm y 280 nm se utilizó para evaluar la pureza del ARN. Cocientes mayores a 1,6 fueron considerados

aceptables. Para calcular la concentración de ARN se consideró que DO=1 equivale a 40 µg/ml.

Los *kits* High-Capacity cDNA Reverse Transcription y la RNase OUT Recombinant Ribonuclease inhibitor 40 U/µl, fueron utilizados para realizar la transcripción inversa del ARN y obtener ADNc. Las cantidades empleadas para las reacciones se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1: Volúmenes de los componentes empleados en la reacción de transcripción inversa.

<i>Componente</i>	<i>Volumen (x1)</i>
<i>10X RT Buffer</i>	2,0 µl
<i>25X dNTP Mix (100mM)</i>	0,8 µl
<i>10X RT Random Primers</i>	2,0 µl
<i>MultiScribe™ Reversa Transcriptasa</i>	1,0 µl
<i>RNase OUT</i>	1,0 µl
<i>H₂O libre de nucleasas</i>	3,2 µl
<i>Volumen total</i>	10,0 µl

A 10 µl de la mezcla de reacción se le agregaron 10 µl de muestra de ARN de concentración conocida (**tabla 5**, sección resultados y discusión), se usaron como máximo 2 µg de ARN total en un volumen final de reacción de 20 µl. El programa utilizado para la reacción de transcripción inversa consiste en un ciclo a 25 °C durante 10 min, 37 °C durante 120 min y 85 °C durante 5 min.

Todas las muestras de ADNc fueron guardadas a -20 °C hasta realizar los ensayos de PCR en Tiempo Real.

4.3.12. Cuantificación de la expresión de los genes *tlr2*, *tnf-α*, *il-1β* e *il-10*

Se empleó la técnica de PCR en Tiempo Real para evaluar los niveles relativos de expresión de los genes *tlr2*, *tnf-α*, *il-1β* e *il-10* en las diferentes muestras de ADNc obtenidas a partir de ARNm extraído de glándula mamaria murina con los tratamientos aplicados (4.3.11). El gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) se incluyó como gen normalizador y las glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control) como condición calibradora.

Los ensayos de PCR en Tiempo Real se llevaron a cabo usando el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix with Low ROX, compatible con el equipo Agilent Mx3000P. Se utilizó el Software MxPro™ QPCR 2007 Stratagene. La mezcla de la reacción y el programa empleados en la reacción de PCR en Tiempo Real fueron los indicados por el fabricante (**tabla 2** y **3**, respectivamente). En la **tabla 4** se presentan los *primers* empleados en las reacciones.

Tabla 2: Volúmenes y concentración de los reactivos empleados en la reacción de PCR en Tiempo Real.

<i>Componente</i>	<i>Volumen (x1)</i>	<i>Concentración final</i>
<i>Agua</i>	-	-
<i>2x QPCR Master Mix with Low ROX</i>	10 µl	1X
<i>Primer F (10µM)</i>	0,7 µl	350 nM
<i>Primer R (10µM)</i>	0,7 µl	350 nM
<i>ADNc</i>	1 µl	
<i>Volumen total</i>	20,0 µl	

Tabla 3: Programa empleado en la reacción de PCR en Tiempo Real.

	<i>Temperatura</i>	<i>Duración</i>	<i>Ciclos</i>
<i>Pre-Desnaturalización</i>	95 °C	3 min	1
<i>Desnaturalización</i>	95 °C	5 seg	40
<i>Annealing/Extensión</i>	60 °C	20 seg	
<i>Curva de disociación</i>	95 °C durante 1 min, 55 °C durante 30 seg y 95 °C durante 30 seg.		1

Tabla 4: *Primers* utilizados en las reacciones de PCR en Tiempo Real.

<i>Molécula</i>	<i>Secuencia Primer</i>	<i>Tamaño de producto</i>	<i>Referencia</i>
TLR2	<i>F= TGG TGT CTG GAG TCT GCT GTG</i> <i>R= CGC TCC GTA CGA AGT TCT CAG</i>	363 pb	<i>Soboll G. y col., 2006</i>
GAPDH	<i>F= CGG CCG CAT CTT CTT GTG</i> <i>R= CCG ACC TTC ACC ATT TTG TCT AC</i>	59 pb	<i>da Silva J.B. y col., 2012</i>
TNF-α	<i>F= CCTATGTCTCAGCCTCTTCTCAT</i> <i>R= CACTTGGTGTTTGCTACGA</i>	214 pb	<i>Song X. y col., 2014</i>

IL1- β	<i>F= TGAAATGCCACCTTTTGACAG</i> <i>R= CCACAGCCACAATGAGTGATAC</i>	185 pb	Song X. y col., 2014
IL-10	<i>F= GCTCTTACTGACTGGCATGAG</i> <i>R= CGCAGCTCTAGGAGCATGTG</i>	105 pb	Lv Q. y col., 2015

F: Forward *R*: Reverse; TLR2: receptor tipo toll 2; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; IL1- β : interleuquina 1 β ; IL-10: interleuquina 10.

Se construyeron curvas estándar a partir de diluciones seriadas de ADNc al cuarto para el par de *primer gapdh*, y diluciones al tercio para los pares de *primer tlr2*, *tnf α* , *il-1 β* , e *il-10* lo que permitió obtener una cantidad de puntos (3 como mínimo) en la fase exponencial para calcular la pendiente con un coeficiente de regresión aceptable (0,8 a 1) y determinar la eficiencia de amplificación (definida como $[10^{(-1/pendiente)}]-1$) de cada gen.

Los niveles de expresión de ARNm se registraron como valores de umbral de ciclo (*cycle threshold*: Ct por sus siglas en ingles) que corresponden al número de ciclos en los que se puede detectar la señal de fluorescencia por encima de un valor de umbral (*threshold*) arbitrario. En todas las reacciones se incluyeron blancos de reacción o controles negativos, donde no se detectó señal de amplificación. La pureza del producto se confirmó mediante curvas de disociación. Para el cálculo de los niveles de expresión relativa de cada gen, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este método es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como la diferencia relativa entre una muestra experimental y una muestra calibradora, asume eficiencias de amplificación óptimas tanto para el gen de interés como para el gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). La cinética de amplificación del gen de interés y el de referencia deben ser aproximadamente iguales, debido a que diferencias en las eficiencias generan errores cuando se utiliza este método (Medhurst *et al.*, 2000; Liu y Saint, 2002).

Todas las muestras fueron evaluadas en la misma corrida y los ensayos se realizaron por duplicado.

4.3.13. Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺/CD69⁺ y CD8⁺/CD69⁺)

4.3.13.1. Marcación de antígenos de superficie de linfocitos T (CD4⁺/CD69⁺ y CD8⁺/CD69⁺) para su análisis por citometría de flujo

Este ensayo se realizó para cuantificar las subpoblaciones de LT (CD4⁺/CD69⁺ y CD8⁺/CD69⁺) por citometría de flujo a fin de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la inmunidad celular. Las muestras de sangre de los ratones fueron sometidas a lisis de glóbulos rojos para la obtención de la población leucocitaria. Para ello se mezcló 1 ml de sangre entera con 12 ml de *buffer* de lisis y se incubó a 4 °C con agitación suave durante 10 min. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 min a 2500 rpm, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS mediante centrifugación durante 5 min a 2500 rpm para eliminar el *buffer* de lisis. Luego, el pellet fue resuspendido en 1 ml de *buffer* de marcación y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer. Se tomaron alícuotas que contenían 5x10⁵ células/ml y se les agregó *buffer* de marcación hasta volumen final 100 µl. Posteriormente, se realizó la tinción con anticuerpos monoclonales anti-CD4*^{FITC} /CD8*^{PE} y anti-CD69*^{APC}. Los anticuerpos se titularon antes del experimento para determinar las concentraciones óptimas de tinción. Para ello, se realizó una determinación con diluciones seriadas sobre una muestra de células obtenidas de sangre de ratones Balb/c. Se utilizaron 5 µl del anticuerpo anti-CD4*^{FITC}/anti-CD8*^{PE} y 2 µl del anti-CD69*^{APC}, en un volumen final de 100 µl de *buffer* de marcación. Inmediatamente después de adicionar los anticuerpos marcados, los tubos Eppendorf, que contenían las células, fueron protegidos de la luz y se realizó una agitación con vórtex. Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se realizó un lavado con 500 µl de *buffer* de marcación mediante centrifugación durante 5 min a 2500 rpm y se descartó el sobrenadante. Por último, se agregaron 200 µl de paraformaldeído al 4%, y se mezcló por pipeteo suave a fin de fijar las células las que se conservaron a 4 °C hasta su análisis. Para la cuantificación por citometría, las células fueron centrifugadas 5 min a 2500 rpm, se descartó el sobrenadante para eliminar el paraformaldeído y se resuspendieron en 200 µl de FACS *buffer*. Se realizaron los correspondientes controles (isotipos, monomarcas y células sin marca) y las muestras se analizaron por duplicado. Este ensayo fue realizado en el Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba donde se utilizó el citómetro de flujo BD FACS Canto II (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.). Los datos fueron obtenidos con el software FACS Diva v. 6.1.2.

4.3.14. Evaluación de anticuerpos totales (IgM, IgG e IgA) específicos para la cepa *E. faecium* EF214 en glándulas mamarias y suero

Los anticuerpos generados contra la cepa EF214 fueron cuantificados a las 360 h (15 días) post-inoculación, en homogenatos de glándulas mamarias (R4 y L4) y en el suero de los ratones de los grupos: control vehículo, EF214 (1×10^8 UFC/ml), y desafío (pre-tratamiento con AE y desafío con la cepa EF214), mediante ELISA indirecto siguiendo el protocolo descrito por Trigo *et al.* (2009), con modificaciones. Para realizar este ensayo, cada glándula fue homogeneizada en 1 ml de PBS para obtener homogenatos que fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis. A partir de los homogenatos se realizaron diluciones (1:10; 1:30; 1:50; 1:80; 1:100) con *buffer* de lavado. Por otro lado, se realizaron diluciones de los sueros con *buffer* de lavado (1:100; 1:200; 1:400; 1:600; 1:800; 1:1000; 1:1100; 1:1200; 1:1400; 1:1600) (Trigo *et al.*, 2009). Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Immulon[®] 2 HB) los pocillos fueron cubiertos con 150 μ l de *buffer* carbonato pH10 y las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C. Luego de este tiempo, los pocillos fueron sensibilizados con 50 μ l de una suspensión de la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) en *buffer* carbonato (volumen final en cada pocillo: 200 μ l). Las placas se incubaron a 4 °C con agitación durante 18 h para permitir la adhesión del antígeno al fondo de los pocillos. Entre cada paso, las placas fueron lavadas con *buffer* de lavado. Posteriormente, se realizó el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos en cada uno de los pocillos de las placas. Para ello se utilizó leche descremada en polvo diluida al 10% en *buffer* de lavado. Se colocaron 100 μ l de la solución y las placas fueron incubadas con agitación a 37 °C, durante 1 h. Posteriormente, se colocaron 100 μ l/pocillo de las diluciones de los homogenatos de glándula mamaria y de los sueros de los ratones de cada uno de los grupos experimentales. Cada dilución se ensayó por triplicado. Las placas se incubaron durante 18 h a 4 °C con agitación. Luego se agregó el anticuerpo secundario (Anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulinas M, G y A de ratón marcado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, USA) diluido 1:2500 en *buffer* de lavado, según especificaciones del fabricante, y se incubó durante 1 h a 37 °C sin agitación. Finalmente, 200 μ l de la solución cromógena de *o*-fenildiamina dihidrocloruro (OPD) fueron colocados (en oscuridad) en cada pocillo y las placas, cubiertas con papel aluminio, se incubaron durante 30 min a 25 °C con agitación. Posteriormente, se midió la DO a 450 nm en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan). Los títulos de anticuerpos se expresaron como la recíproca de la dilución más alta, donde la DO tuvo un valor de 0,1 por encima de la DO del blanco de reacción (Tavares *et al.*, 1995).

4.4. Análisis estadísticos

Los valores obtenidos en cada uno de los ensayos realizados fueron expresados como promedios y desviación estándar ($\bar{X} \pm DS$). Los parámetros fueron comparados utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01 software (Inc. San Diego, USA, 2007) y evaluados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y el test de comparación múltiple (Tukey) usando el programa mencionado anteriormente. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención del aceite esencial de *M. verticillata*

A partir de 60 g de la especie recolectada en la localidad de Villa Larca (San Luis), se obtuvieron 3,3 ml de aceite, con un valor de densidad igual a 0,92 g/ml. En función de estos valores el rendimiento fue de 5,1% p/v. A partir de otra muestra representativa de *M. verticillata* (60 g) proveniente de la localidad de Santa Rosa (Córdoba) se obtuvieron 2,5 ml, la densidad de fue igual a 0,916 g/ml y el rendimiento se calculó a partir del material de partida en 4,19% p/v. Ambas muestras oleosa presentaron un color amarillo pálido, olor aromático típico. Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por De Feo *et al.* (1998); Primo *et al.* (2001); Cariddi *et al.* (2011b) y Escobar *et al.* (2012) quienes trabajaron en idénticas condiciones experimentales y con la misma especie vegetal.

5.1.1. Identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *M. verticillata*

La composición química del AE obtenido de *M. verticillata* colectada en la localidad de Villa Larca (San Luis), se analizó mediante CG-MS y se identificaron 13 compuestos (**tabla 1, anexo I**).

Entre los componentes mayoritarios encontrados se destacó la presencia de pulegona y mentona con valores de 51,66% y 37,79%, respectivamente. Otros compuestos destacados fueron cis-mentona (1,38%), piperitona (1,40%) y limoneno (1,14%) (**figura 13**).

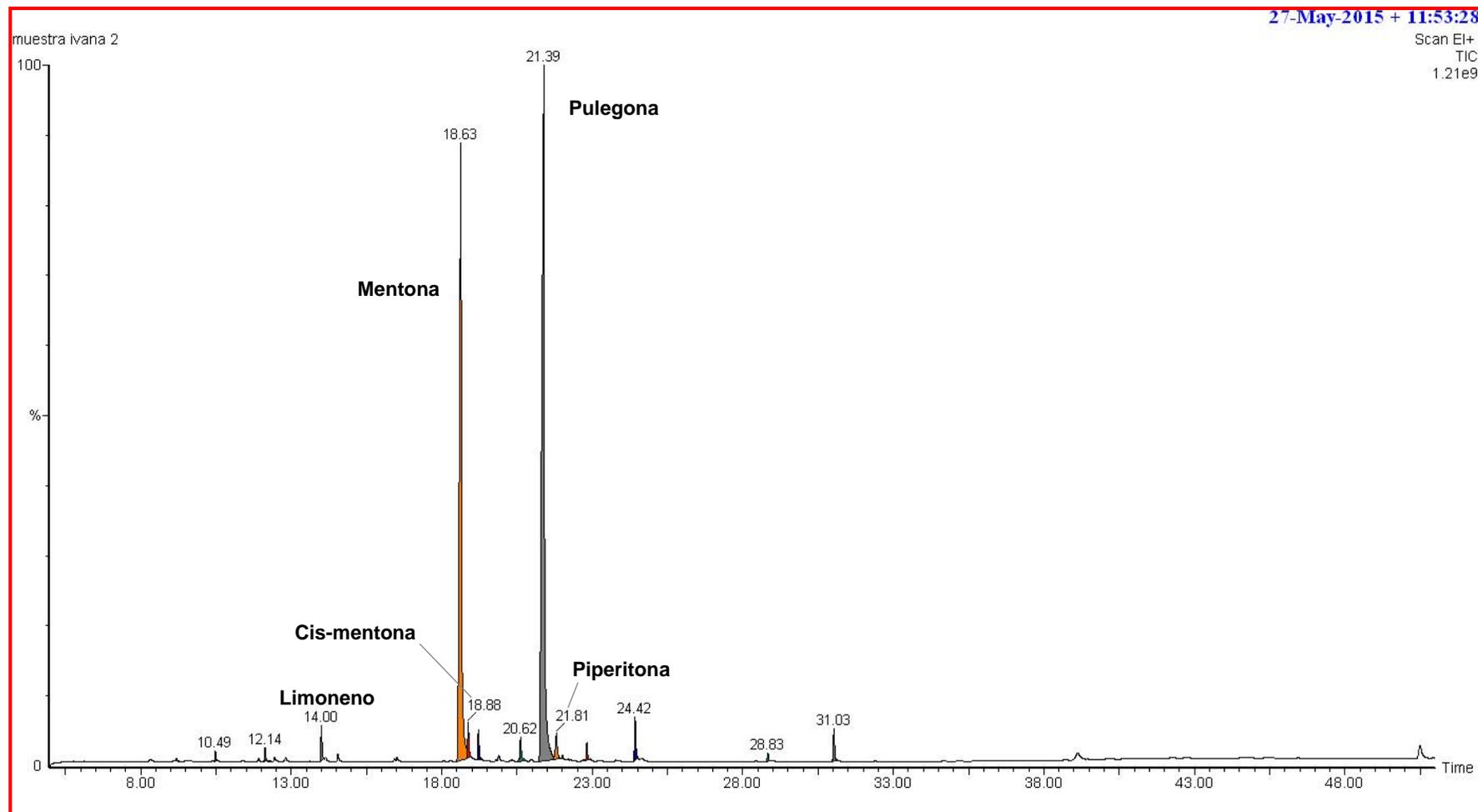


Figura 13: Perfil cromatográfico obtenido por CG-MS del aceite esencial obtenido de la especie *M. verticillata* proveniente de la localidad de Villa Larca, Provincia de San Luis, Argentina. El área representada por los picos, corresponde a las proporciones en las que se encuentra cada componente en dicha mezcla. Se observan los tiempos de retención sobre cada pico.

La composición química de los aceites esenciales (AEs) puede variar considerablemente a nivel intraespecífico dependiendo del genotipo, de las condiciones de extracción y de factores ambientales como las condiciones climáticas, localización geográfica y fecha de recolección (Lamien-Meda *et al.*, 2010). De ahí que algunas de las principales fuentes de AEs se reconozcan como variedades, ecotipos y/o quimiotipos diferentes (Torras *et al.*, 2007; Lamien-Meda *et al.*, 2010). El concepto quimiotipo ha sido definido para caracterizar una muestra oleosa considerando exclusivamente aquellos dos o tres componentes principales. Zygodlo *et al.* (1996), realizaron un análisis por CG del AE de *M. verticillata* proveniente de diferentes áreas geográficas de Argentina y encontraron que existe una gran variación en cuanto a la composición química de las muestras. Considerando los principales componentes del AE de *M. verticillata* se encontraron tres quimiotipos. El **1**, cuyo componente principal es carvona, el quimiotipo **2**, donde timol-carvacrol son los compuestos mayoritarios y el **3** donde pulegona-mentona son los compuestos que aparecen en mayor proporción en el AE. Considerando esta descripción, el análisis cromatográfico realizado en el presente trabajo demuestra que el AE de *M. verticillata* corresponde al quimiotipo número **3**.

Los componentes mayoritarios encontrados en el AE obtenido de la especie *M. verticillata* proveniente de la provincia de Villa Larca San Luis, y en porcentajes similares, fueron informados por Escobar *et al.* (2015).

González Pereyra *et al.* (2005) y Cariddi *et al.* (2011b) informaron la composición mediante CG, del AE obtenido de la especie *M. verticillata* proveniente de la localidad de Santa Rosa, Córdoba, la abundancia de los compuestos mayoritarios fue similar al AE de *M. verticillata* proveniente de San Luis analizado en el presente estudio.

Juarez *et al.* (2018) evaluaron la composición química del AE de *M. verticillata* proveniente de diferentes localidades de San Luis y colectadas en distintas épocas del año e informaron que pulegona y mentona fueron los compuestos mayoritarios en todos los AEs obtenidos de las diferentes muestras analizadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo donde el análisis cromatográfico del AE demostró que pulegona y mentona fueron los compuestos mayoritarios presentes en la muestra oleosa.

5.2. Ensayos *in vitro*

5.2.1. Ensayo de viabilidad celular en células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T) mediante el método de reducción del MTT

La viabilidad celular en células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T) fue evaluada mediante el método de reducción del MTT. Los resultados se presentan en la (Figura 14).

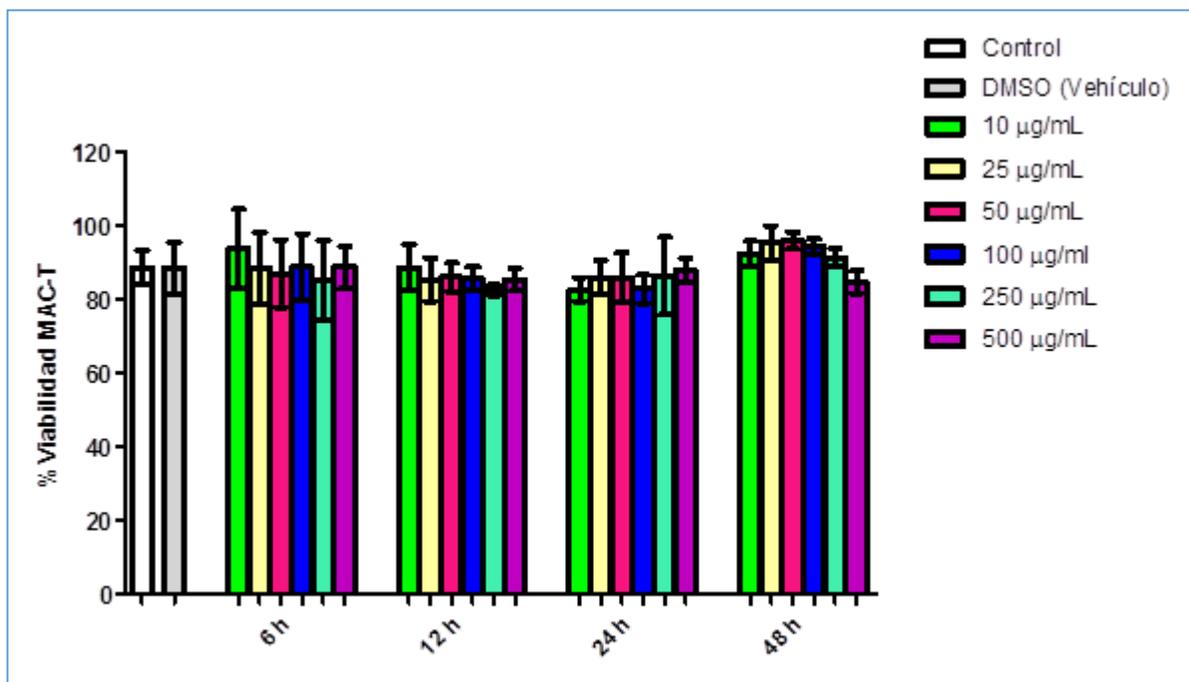


Figura 14: Porcentaje de viabilidad de células MAC-T en función del tratamiento *in vitro* con diferentes concentraciones del AE de *M. verticillata*.

El AE obtenido de la especie *M. verticillata* proveniente de San Luis no afectó la viabilidad de las células MAC-T independientemente de la concentración (0, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/ml) o tiempo (6, 12, 24 y 48 h) ensayados (**figura 14**).

Durante este ensayo si bien se observó una leve disminución de la viabilidad celular en el tratamiento a 24 h ésta no fue significativa respecto al control. Otro hallazgo fue el incremento de la viabilidad celular en el tratamiento a 48 h respecto a los demás tiempos ensayados. Este aumento en los porcentajes de viabilidad a las 48 h de tratamiento, podría deberse a que las células MAC-T tienen un ciclo de división cada 17 h (Huynh., 1991) por lo que a las 48 h las

células han experimentado 2 ciclos de división, y el número de células en cada pocillo es mayor (**figura 14**).

El ensayo de reducción del MTT es utilizado para evaluar la capacidad de sustancias tóxicas de inducir un daño temprano en las células, por ejemplo, la alteración de la función mitocondrial (Fentem, 1994). A partir de los resultados obtenidos se demostró que ninguna de las concentraciones ensayadas del AE (10, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/ml) afectó la función mitocondrial de las células MAC-T en los diferentes tiempos ensayados (6, 12, 24 y 48 h).

Abdillahi *et al.* (2012) describieron que una droga es tóxica sobre una célula cuando induce daño por encima del 50% de las células tratadas, es débilmente tóxica cuando el porcentaje de viabilidad celular se encuentra entre 50-70% y no es tóxica cuando este porcentaje es mayor al 70 %. Coincidente con estos autores se puede afirmar que el AE de *M. verticillata* no resultó tóxico para las células MAC-T.

Los efectos tóxicos de AE de *M. verticillata* han sido evaluados tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes tipos de células. Sutil *et al.* (2006) demostraron que el AE de *M. verticillata* y sus principales metabolitos activos (pulegona, mentona y limoneno) no resultaron tóxicos sobre células Vero (células de riñón de mono verde africano) ni sobre células HEp-2 (células de carcinoma epidermoide humano) luego de 72 h de exposición. Estos resultados coincidieron con los de Escobar *et al.* (2012) quienes demostraron que el AE de *M. verticillata* en una línea de células Vero no afectó la viabilidad de estas en las concentraciones ensayadas (10 a 1000 µg/ml) luego de 48 h de exposición.

Cariddi *et al.* (2011b) evaluaron la viabilidad de PBMCs luego de la exposición a diferentes concentraciones del AE de *M. verticillata* (6×10^3 -0,006 µg/ml) y de sus principales componentes pulegona ($6,2 \times 10^3$ -0,0062 µg/ml), mentona (6×10^3 -0,006 µg/ml) y limoneno ($5,5 \times 10^3$ -0,0055 µg/ml). Estos autores demostraron que ninguna de las concentraciones ensayadas del AE o de sus componentes principales afectó la viabilidad de este tipo de células.

Escobar *et al.* (2015) determinaron el efecto tóxico del AE de *M. verticillata* en ratas Wistar luego de la administración oral durante 90 días. En este estudio se demostró que esta fracción vegetal (1,4 y 7 mg/kg) no alteró el peso de los animales tratados ni se observaron alteraciones histopatológicas en hígado, riñón e intestino. Tampoco produjo efectos citogenotóxicos en células de la sangre o de médula ósea.

Los resultados obtenidos respecto a la toxicidad del AE de *M. verticillata*, se suma como un nuevo conocimiento sobre la toxicidad en células, la búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos no arrojó resultados referidos a los efectos del AE de *M. verticillata* sobre células MAC-T, éste es el primer informe en relación al efecto sobre la viabilidad de las células MAC-T tratadas con el AE de *M. verticillata*.

5.2.2. Efecto del aceite esencial de *M. verticillata* sobre la fagocitosis en una línea de macrófagos murinos (RAW 264.7)

5.2.2.1. Ensayo de proliferación

En la **figura 15** se observa el efecto del AE (50 µg/ml) sobre la proliferación de las RAW 264.7.

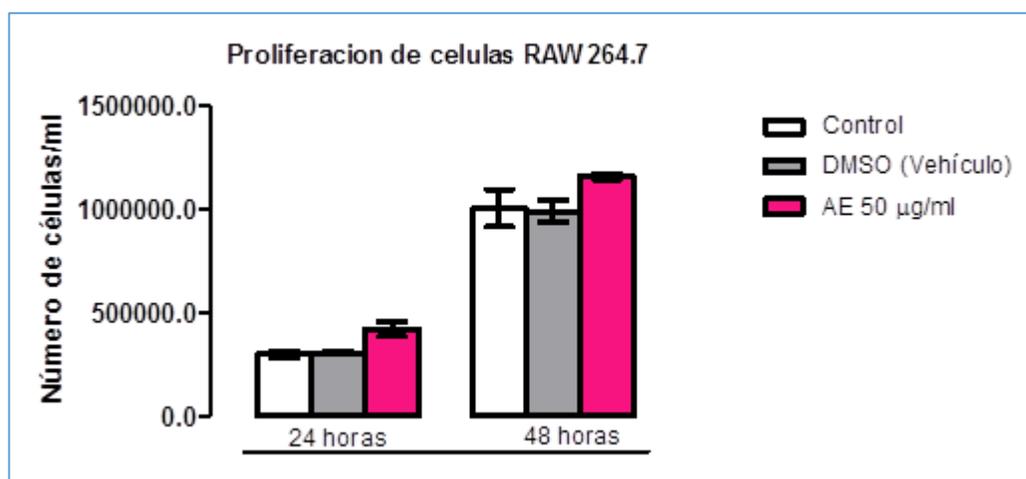


Figura 15: Efecto del AE de *M. verticillata* en la proliferación de células RAW 264.7.

Los resultados muestran que el AE (50 µg/ml) no indujo la proliferación de las células RAW 264.7, debido a que el número de células/ml tratadas con AE durante 24 y 48 h, se mantuvo sin diferencias con respecto al número de células/ml de los grupos control y DMSO (vehículo) (**figura 15**).

5.2.2.2. Evaluación de adherencia de células RAW 264.7

En la **figura 16**, se muestra el efecto de AE 50 $\mu\text{g/ml}$ sobre la adherencia de las células RAW 264.7 a la base de los pocillos de una microplaca.

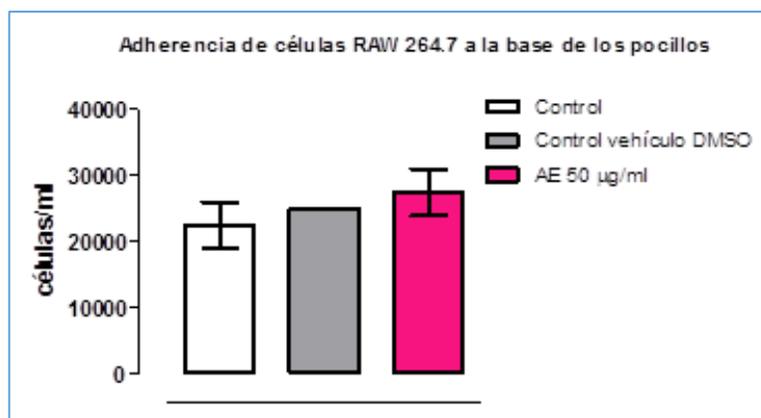


Figura 16: Efecto del AE de *M. verticillata* en la adherencia natural de células RAW 264.7 a la base del pocillo de una microplaca.

El número de células/ml que fueron tratadas con AE 50 $\mu\text{g/ml}$ y que se adhirieron a la base de la microplaca se mantuvo sin diferencias con respecto al número de células/ml de los grupos control y control vehículo (**figura 16**). Este resultado indica que AE no interfiere con la adhesión normal de las células RAW 264.7 a la base de los pocillos.

5.2.2.3. Ensayo de adherencia y fagocitosis de células RAW 264.7

A partir del recuento de 100 células RAW 264.7 en el microscopio óptico (100X), se determinó el porcentaje de macrófagos que adhirieron y fagocitaron levaduras y el número de levaduras adheridas y fagocitadas por esas células.

En la **figura 17** se observan microfotografías de la levadura *S. cerevisiae* adheridas a macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 en ausencia y presencia de AE.

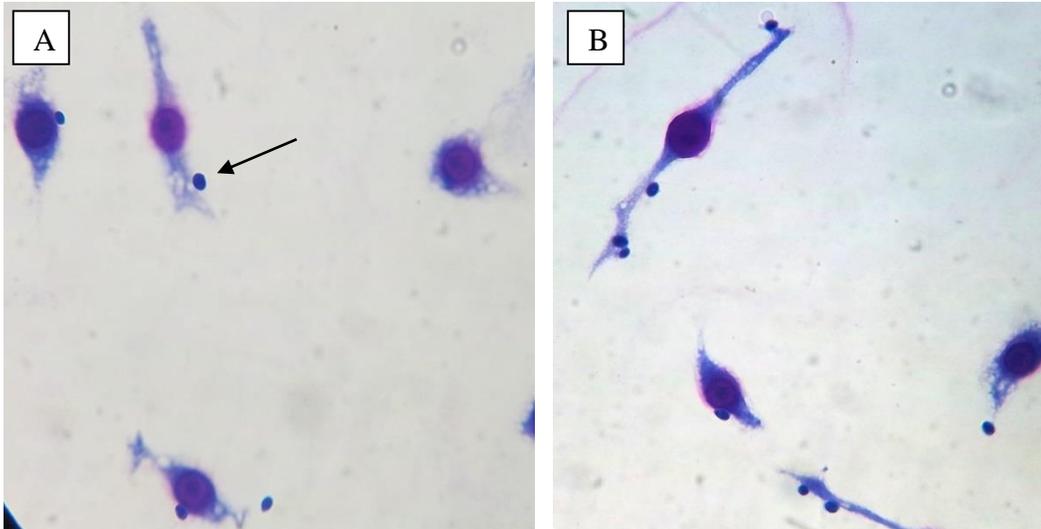


Figura 17: Microfotografía de *S. cerevisiae* (flecha) adheridas a células RAW 264.7. **A)** Control; **B)** Células expuestas a AE 50 µg/ml (100X).

En la **figura 18** se observa el porcentaje de adherencia, es decir el número de células RAW 264.7 tratadas con diferentes concentraciones de AE (0,5; 5; 50; 60 y 75 µg/ml) que adhirieron levaduras.

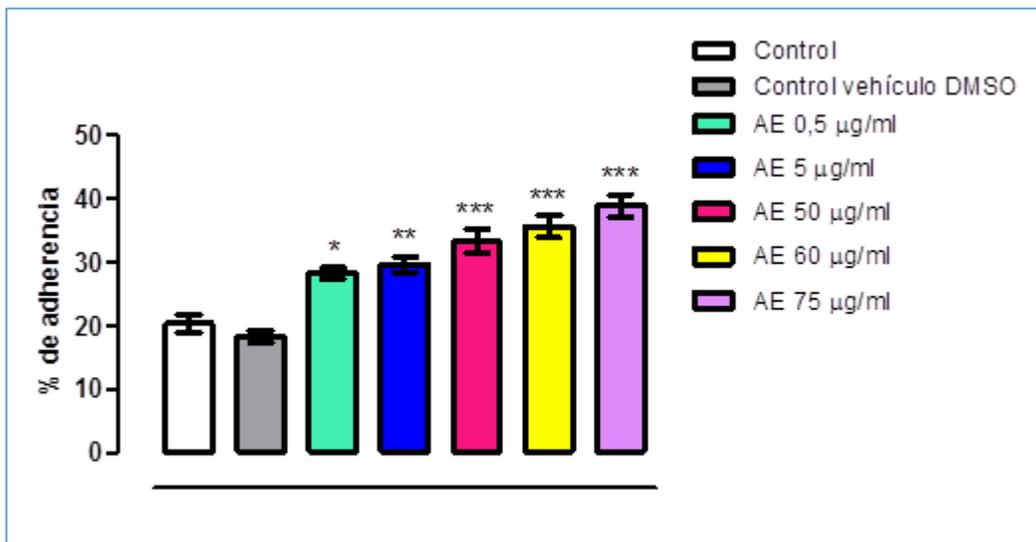


Figura 18: Porcentaje de adherencia (número de células RAW 264.7 que adhirieron levaduras) en función del tratamiento *in vitro* con diferentes concentraciones del AE de *M. verticillata*.

Los resultados obtenidos muestran un incremento en el porcentaje de adherencia de manera dosis-dependiente. Todas las concentraciones de AE ensayadas (0,5; 5; 50; 60 y 75 $\mu\text{g/ml}$) mostraron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$, respectivamente) (**figura 18**).

En la **figura 19** se observa el número de levaduras adheridas a las células RAW 264.7, luego del tratamiento con AE (0,5; 5; 50; 60 y 75 $\mu\text{g/ml}$).

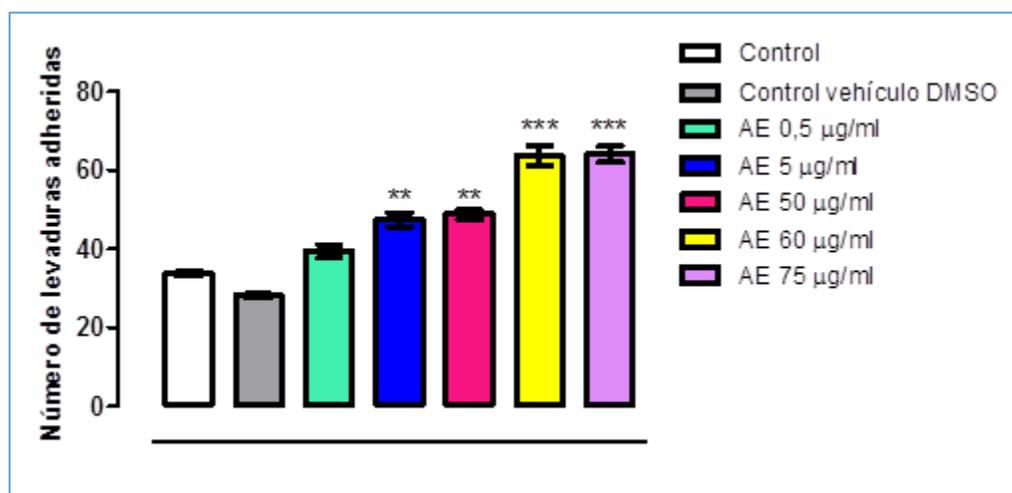


Figura 19: Número de levaduras adheridas a las células RAW 264.7 en función del tratamiento *in vitro* con diferentes concentraciones del AE de *M. verticillata*.

Los datos obtenidos muestran un incremento en el número de levaduras adheridas a las células RAW 264.7, luego del tratamiento con AE. Las concentraciones 5, 50, 60 y 75 $\mu\text{g/ml}$ presentaron diferencias estadísticas significativas respecto al control ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente) (**figura 19**).

En la **figura 20** se muestran microfotografías de *S. cerevisiae* fagocitadas por macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 en ausencia y presencia de AE.

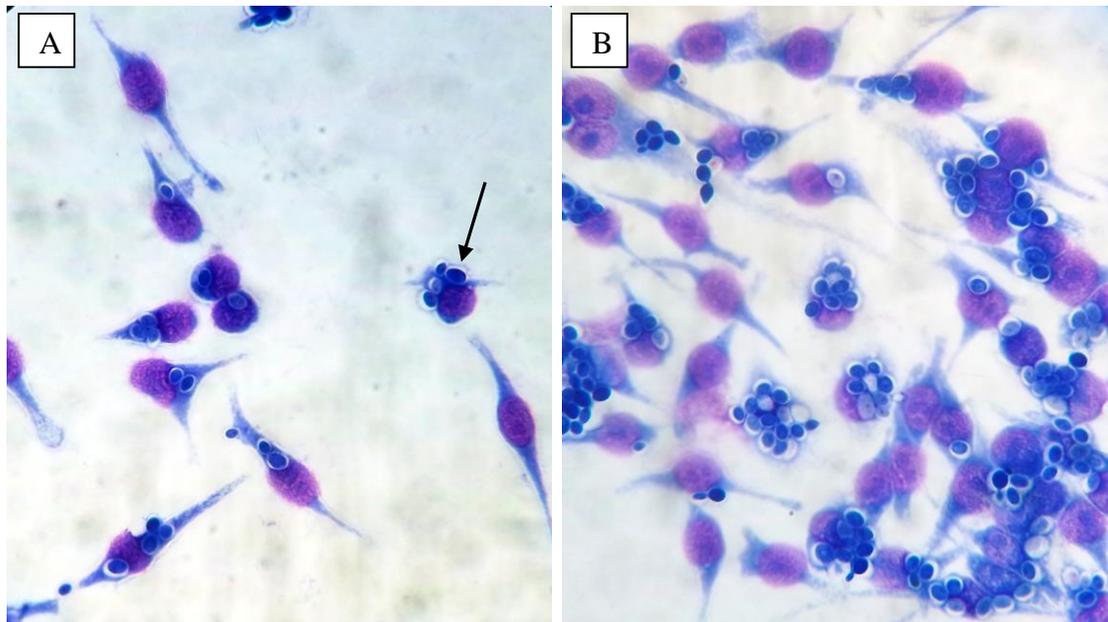


Figura 20: Microfotografía de *S. cerevisiae* (flecha) fagocitadas por células RAW 264.7. **A)** Control; **B)** Células expuestas a AE 50 µg/ml (100X).

En la **figura 21** se observa el porcentaje de fagocitosis, es decir el número de células RAW 264.7 tratadas con diferentes concentraciones de AE (0,5; 5; 50; 60 y 75 µg/ml) que fagocitaron levaduras.

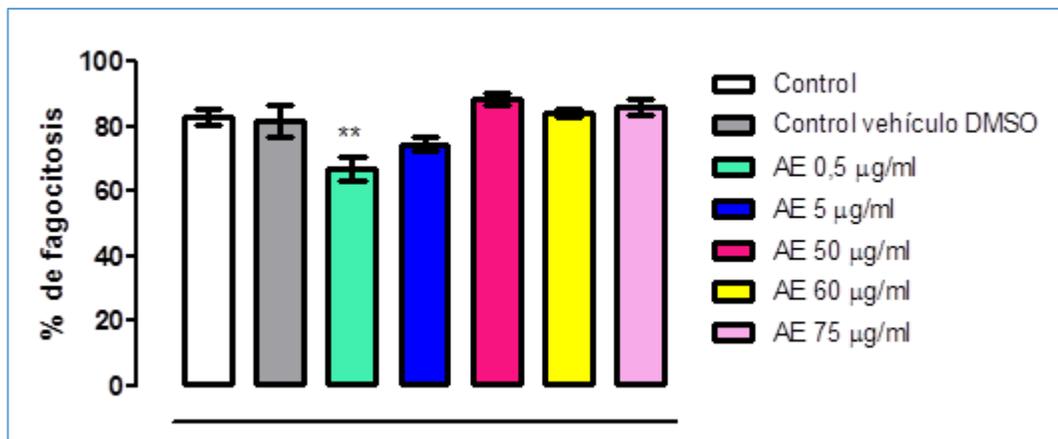


Figura 21: Porcentaje de fagocitosis (número de células RAW 264.7 que fagocitaron levaduras) en función del tratamiento *in vitro* con diferentes concentraciones del AE de *M. verticillata*.

En relación a la actividad fagocítica, no se observó incremento en el número de macrófagos que fagocitaron levaduras en ninguno de los tratamientos con AE, independientemente de las concentraciones ensayadas (**figura 21**).

En la **figura 22** se observa el número de levaduras fagocitadas por las células RAW 264.7, luego del tratamiento con AE (0,5; 5; 50; 60 y 75 $\mu\text{g/ml}$).

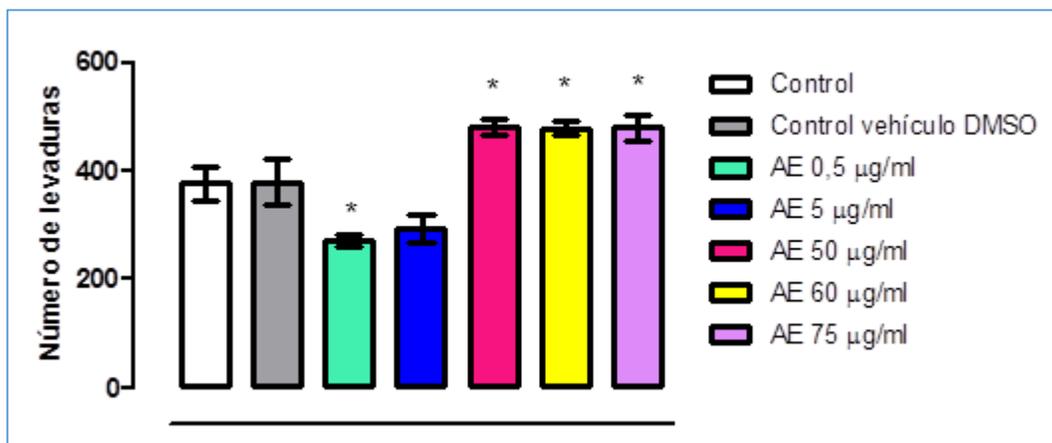


Figura 22: Número de levaduras fagocitadas por las células RAW 264.7 en función del tratamiento *in vitro* con diferentes concentraciones del AE de *M. verticillata*.

Como se mencionó anteriormente ninguna de las concentraciones evaluadas de AE afectó la actividad fagocítica de los macrófagos RAW 264.7 (**figura 21**). Sin embargo en la **figura 22** puede observarse que el número de levaduras fagocitadas aumentó significativamente con respecto al control cuando los macrófagos fueron expuestos a AE (50, 60 y 75 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0,05$).

5.2.2.4. Evaluación de la viabilidad de levaduras luego de la fagocitosis por células RAW 264.7

Según lo observado en el punto anterior (5.2.2.3), la presencia del AE alteró los mecanismos de adherencia y la capacidad fagocítica de las células RAW 264.7, por lo que el siguiente paso fue analizar si el tratamiento con AE (50 $\mu\text{g/ml}$) podría afectar la capacidad de estas células de eliminar el material fagocitado.

En la **figura 23** se observa el efecto de AE (50 $\mu\text{g/ml}$) sobre la viabilidad de las levaduras fagocitadas por las células RAW 264.7.

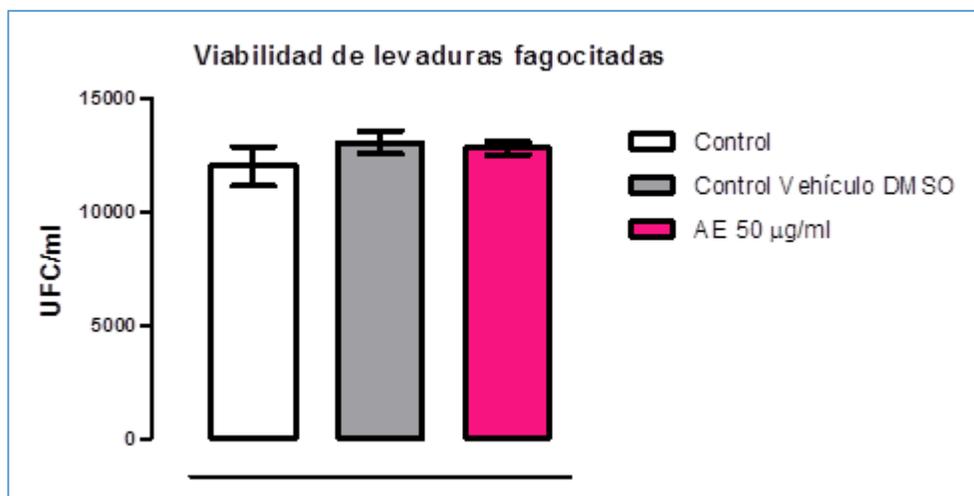


Figura 23: Efecto del AE de *M. verticillata* sobre la viabilidad de *S. cerevisiae* fagocitadas por células RAW 264.7.

Los resultados obtenidos mostraron que la viabilidad de las levaduras fagocitadas por macrófagos murinos RAW 264.7 no fue afectada en presencia del AE (50 $\mu\text{g/ml}$) debido a que no se observó diferencia estadísticamente significativa respecto al control (**figura 23**). Es probable que la disminución de la viabilidad de las levaduras no pueda observarse estadísticamente debido a que el número de levaduras fagocitadas en presencia de AE (50 $\mu\text{g/ml}$) aumentó significativamente respecto al control (**figura 22**).

5.2.2.5. Dosaje de óxido nítrico (NO)

La producción de NO es uno de los posibles mecanismos microbicidas de macrófagos. La capacidad de las células RAW 264.7 de producir NO en presencia de AE (50 $\mu\text{g/ml}$), fue evaluada indirectamente por los niveles de nitrito (NO_2^-) en el sobrenadante de cultivo. El dosaje de NO fue realizado a diferentes tiempos (30, 60, 120, 180 y 240 min) (**figura 24**).

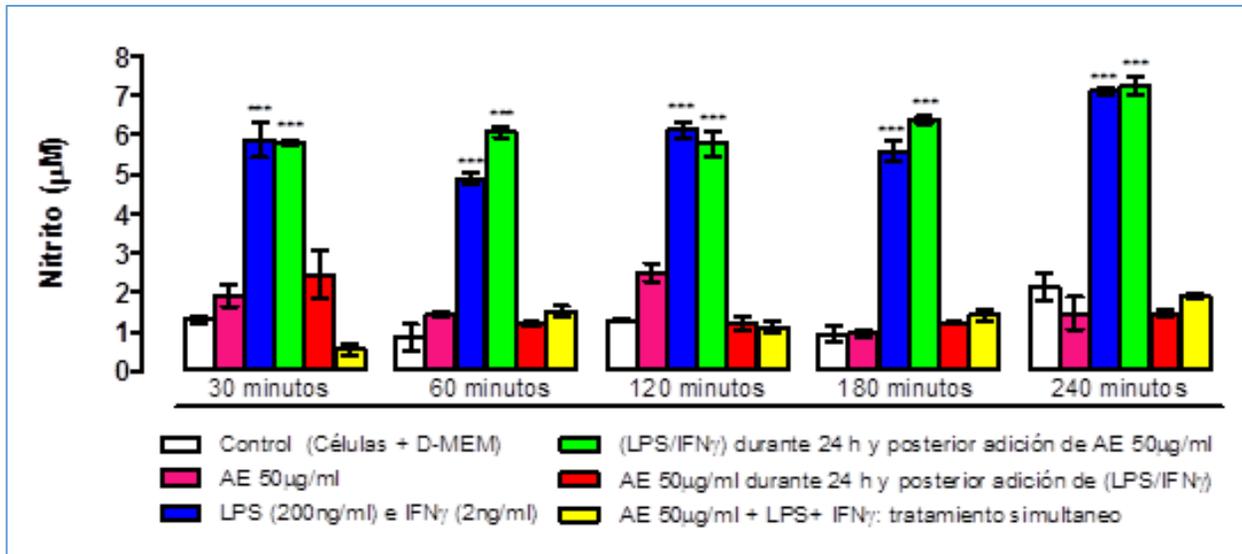


Figura 24: Dosaje de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 tratadas con AE (50 µg/ml) LPS e IFN-γ.

Los resultados obtenidos muestran que las células RAW 264.7 en presencia de AE (50 µg/ml) no producen niveles significativos de NO, en ninguno de los tiempos ensayados. Cuando las células fueron tratadas con AE (50 µg/ml) la concentración de NO se mantuvo sin diferencia con los niveles de NO producidos en el control. Los niveles de NO aumentaron significativamente con respecto al control cuando las células fueron estimuladas con LPS (200 ng/ml) e IFN-γ (2 ng/ml) ($p < 0,001$). Este resultado fue el esperado, ya que el LPS es un antígeno presente en bacterias Gram negativas y el IFN-γ es una citoquina que activa a los macrófagos. Cuando las células fueron estimuladas con LPS (200 ng/ml) e IFN-γ (2 ng/ml) durante 24 h y luego tratadas con AE (50 µg/ml) (barras verdes) la concentración de NO aumentó con respecto al control ($p < 0,001$) pero sin diferencia significativa respecto al tratamiento con LPS/IFN-γ (barras azules) (**figura 24**).

Se realizaron otros dos tratamientos, en uno, las células fueron tratadas durante 24 h con AE (50 µg/ml) y luego estimuladas con LPS (200 ng/ml) e IFN-γ (2 ng/ml) (barras rojas) y en el otro, las células recibieron AE (50 µg/ml), LPS (200 ng/ml) e IFN-γ (2 ng/ml) de manera simultánea (barras amarillas). En ambos casos, no se observó incremento en la producción de NO comparado con el control, por el contrario, los niveles de NO fueron inferiores a los

observados en los tratamientos con LPS e IFN- γ ($p < 0,001$). Este hallazgo sugeriría que AE tendría un efecto anti-inflamatorio inhibiendo la actividad del LPS e IFN- γ (**figura 24**).

5.2.2.6. Dosaje de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Otro mecanismo importante en el efecto microbicida del macrófago es la producción de especies ROS. La capacidad de células RAW 264.7 de producir ROS en presencia de AE de *M. verticillata* (50 $\mu\text{g/ml}$), se evaluó mediante la detección de la intensidad de fluorescencia. Las especies ROS se midieron en diferentes tiempos (15, 30, 45, 60, 120, 180 y 240 min) (**figura 25**).

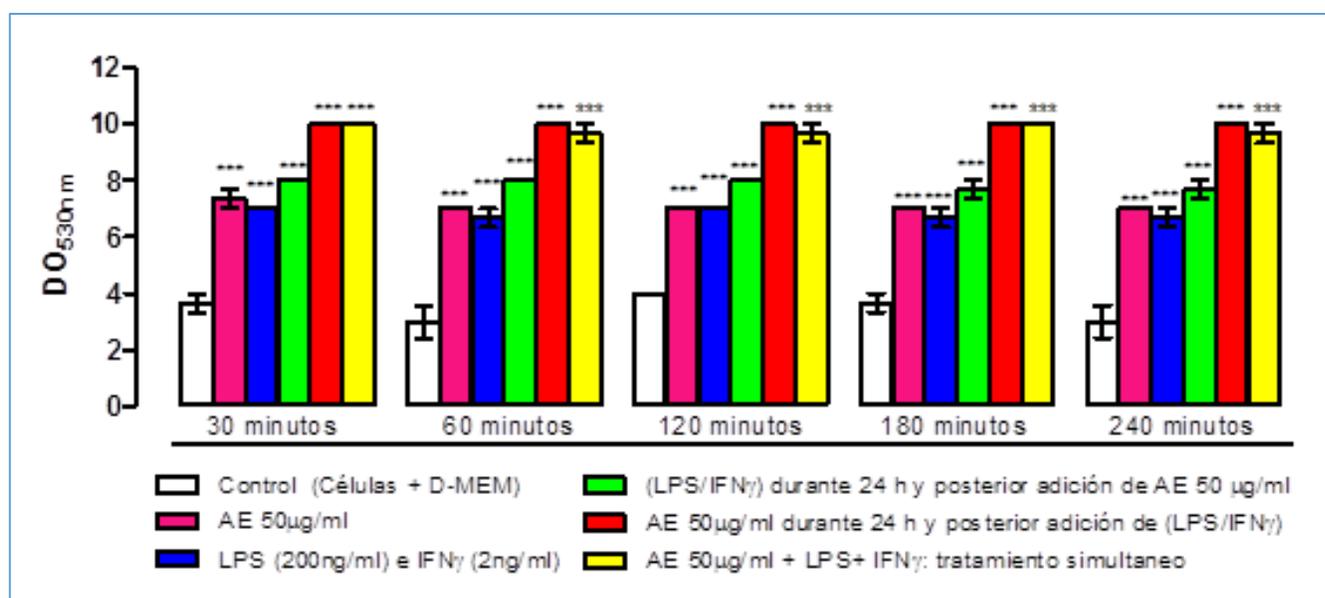


Figura 25: Dosaje de especies reactivas del oxígeno (ROS) en cultivo de células RAW 274.7, tratadas con AE (50 $\mu\text{g/ml}$), LPS e IFN γ .

En la **figura 25** se observa que las células en presencia de AE (50 $\mu\text{g/ml}$) produjeron niveles significativos de ROS respecto al control ($p < 0,001$), estos valores fueron semejantes para todos los tiempos analizados. Un resultado similar fue observado en las células estimuladas con LPS (200 ng/ml) e IFN- γ (2 ng/ml) (barras azules) y en las células estimuladas con LPS (200 ng/ml) e IFN- γ (2 ng/ml) durante 24 h y luego tratadas con AE (50 $\mu\text{g/ml}$) (barras verdes).

Se realizaron otros dos tratamientos, en uno, las células fueron tratadas durante 24 h con AE (50 µg/ml) y luego estimuladas con LPS (200 ng/ml) e IFN- γ (2 ng/ml) (barras rojas) y en el otro, las células recibieron AE (50 µg/ml), LPS (200 ng/ml) e IFN- γ (2 ng/ml) de manera simultánea (barras amarillas). En ambos casos, se observó un incremento en la producción de ROS respecto al control ($p < 0,001$) y además estos niveles fueron superiores a los observados en los tratamientos con LPS e IFN- γ (barras azules) ($p < 0,001$) (**figura 25**). Estos hallazgos sugieren que AE (50 µg/ml) incrementó la producción de ROS en las células RAW 264.7

En la bibliografía consultada no se describen estudios referidos a los efectos del AE de *M. verticillata* sobre la fagocitosis de macrófagos murinos (línea RAW 264.7), siendo éste el primer trabajo en esta temática.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* demostraron que el AE de *M. verticillata* no interfiere en la adherencia natural de los macrófagos a las microplacas ni tampoco induce la proliferación de los mismos. Es de destacar que luego del tratamiento con el AE (0; 0,5; 5; 50; 60 y 75 µg/ml) se observó un significativo incremento dosis-dependiente en: **a**) el porcentaje de adherencia (número de macrófagos que adhirieron levaduras), **b**) en el número de levaduras adheridas a los macrófagos y **c**) en el número de levaduras fagocitadas. Estos resultados demostraron el efecto activador del AE sobre los mecanismos de adherencia y fagocitosis de las células RAW 264.7.

También se realizó el dosaje de NO y ROS para evaluar el efecto de AE sobre el mecanismo microbicida dependiente del oxígeno. Para ello se realizaron diferentes tratamientos incorporando a las células AE (50 µg/ml), LPS e IFN- γ . Los resultados revelaron que en las células tratadas durante 24 h con AE y luego estimuladas con LPS e IFN- γ o en aquellas tratadas con los tres compuestos de manera simultánea, no hubo incremento en la producción de NO comparada con el control. Por el contrario, fue inferior a la observada en los tratamientos con LPS e IFN- γ solos. Este hallazgo sugiere que el AE tendría un efecto anti-inflamatorio inhibiendo la actividad del LPS e IFN- γ . Por otro lado, la producción de ROS se vio incrementada por la presencia de AE en todos los tratamientos, lo que demostró que el aceite activaría este mecanismo microbicida en los macrófagos vía síntesis de especies reactivas del oxígeno. Este resultado sugiere la evaluación futura del efecto que pudiera tener el AE sobre las enzimas NADPH oxidasa, superóxidodismutasa o mieloperoxidasa.

La activación de los macrófagos por LPS aumenta la producción de citoquinas pro-inflamatorias y de NO que son los principales mecanismos que participan en la respuesta innata en muchos mamíferos (Nathan, 1992; Moncada, 1999; Bosca *et al.*, 2005). La sobreproducción de NO por macrófagos activados se ve implicado en la fisiopatología de muchas enfermedades inflamatorias (Bosca *et al.*, 2005).

En el presente estudio se demostró que el AE no alteró la producción de NO en macrófagos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que han estudiado otros aceites esenciales. Kim *et al.* (2013) demostraron que la producción de NO se vio inhibida de manera dosis-dependiente en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y aceite esencial (0,005% 0,01% y el 0,02%) de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* una planta medicinal originaria de la India, respecto a las células estimuladas con LPS sólo. Otro estudio reveló que células RAW 264.7 estimuladas con LPS y aceite esencial de *Lindera umbellata* (25 y 50 µg/ml), una planta utilizada en medicina tradicional en Japón, exhibieron una disminución en la producción de NO de manera dosis-dependiente con respecto al control positivo (células estimuladas con LPS) (Maeda *et al.*, 2013). Sun *et al.* (2014) también observaron un efecto anti-inflamatorio del aceite esencial de *Mentha piperita* (5, 25, 50 y 100 µg/ml) sobre células RAW 264.7 luego de ser estimuladas con LPS.

Diversos trabajos reportan el efecto de aceites esenciales o compuesto puros aislados de plantas medicinales sobre la inhibición en la producción de ROS en células RAW 264.7 (Choi *et al.*, 2007; Bak *et al.*, 2012; Chou *et al.*, 2012, 2013). Estos hallazgos no coinciden con lo obtenido en el presente trabajo donde AE de *M. verticillata* estimuló la producción de ROS por parte de las células RAW 264.7.

Las ROS no solo cumplen una función importante en la inmunidad innata eliminando los patógenos fagocitados por los macrófagos, sino que también se ha descrito que las ROS estimularían la activación redox de la vía de señalización de NF-κB y por lo tanto la transcripción de genes de citoquinas pro-inflamatorias (Kabe *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en los ensayos de fagocitosis demuestran claramente el efecto activador del AE de *M. verticillata* sobre este mecanismo ejercido por macrófagos, células que desempeñan un rol fundamental en la inmunidad innata.

5.3. Ensayos *in vivo*

5.3.1. Efecto de la dosis y tiempo de exposición del aceite esencial de *M. verticillata* mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras

5.3.1.1. Examinación macroscópica post-mortem de las glándulas mamarias inoculadas con aceite esencial de *Minthostachys verticillata*

En la **figura 26**, se muestran fotografías de las glándulas mamarias de los animales inoculados con distintas concentraciones de AE (25, 50 y 100 µg/ml) a las 24, 48 y 72 h post-inoculación.

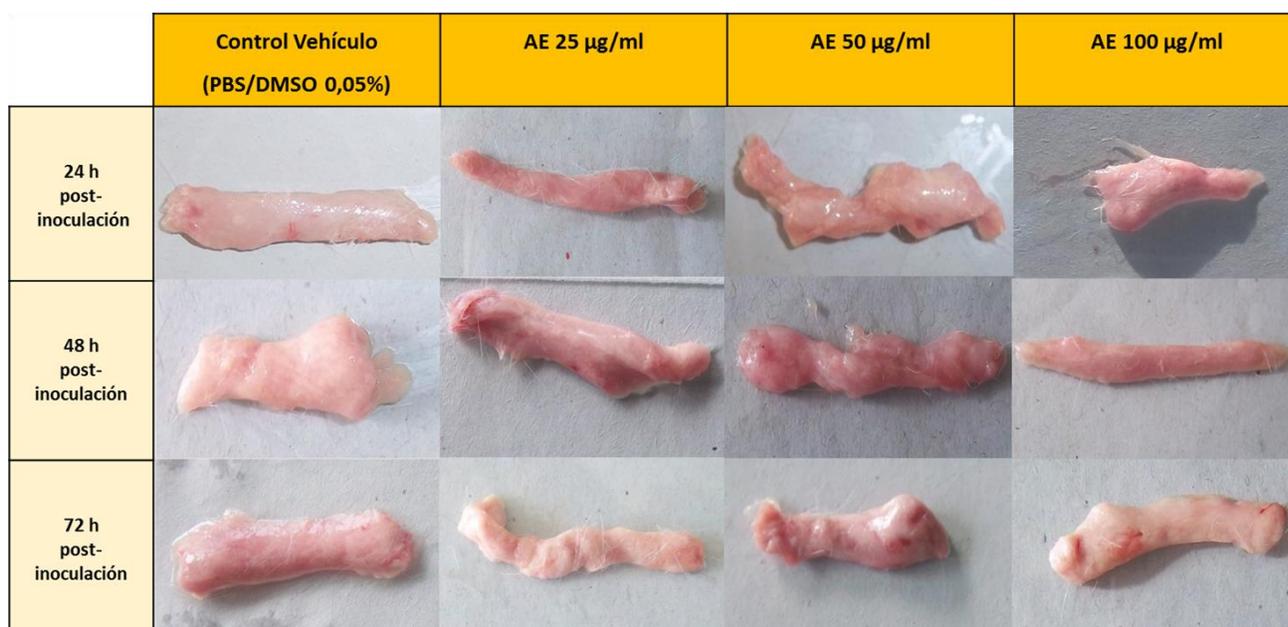


Figura 26: Fotografías representativas de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo) y AE (25, 50 y 100 µg/ml), a distintos tiempos post-inoculación. No se observan alteraciones macroscópicas en ninguna de las glándulas tratadas. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio.

Las glándulas mamarias de los animales del grupo control vehículo, no presentaron alteraciones macroscópicas tales como inflamación, decoloración, exudación o formación de abscesos, a los diferentes tiempos ensayados. Por otro lado, las glándulas mamarias que recibieron diferentes concentraciones de AE, se mostraron similares a las del grupo control para los distintos tiempos evaluados (**figura 26**).

En la **figura 27**, se observa el tamaño y peso promedio de las glándulas mamarias.

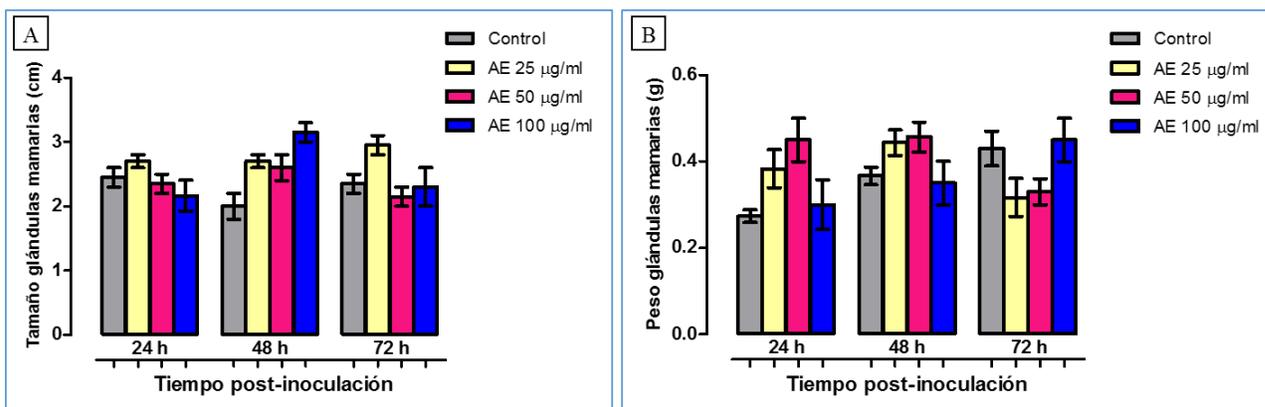


Figura 27: A) Tamaño y B) peso promedio de las glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con AE (25, 50 y 100 µg/ml), a distintos tiempos post-inoculación. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio.

Se observaron variaciones en el tamaño y peso de las glándulas mamarias tratadas con AE, respecto al grupo control, a los diferentes tiempos. Sin embargo, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas (**figura 27**).

5.3.1.2. Examinación histopatológica de las glándulas mamarias inoculadas con aceite esencial de *M. verticillata*

En la **figura 28**, se muestran microfotografías del análisis histopatológico realizado a las glándulas mamarias de los ratones inoculados con diferentes concentraciones de AE (25, 50 y 100 µg/ml) a las 24, 48 y 72 h post-inoculación.

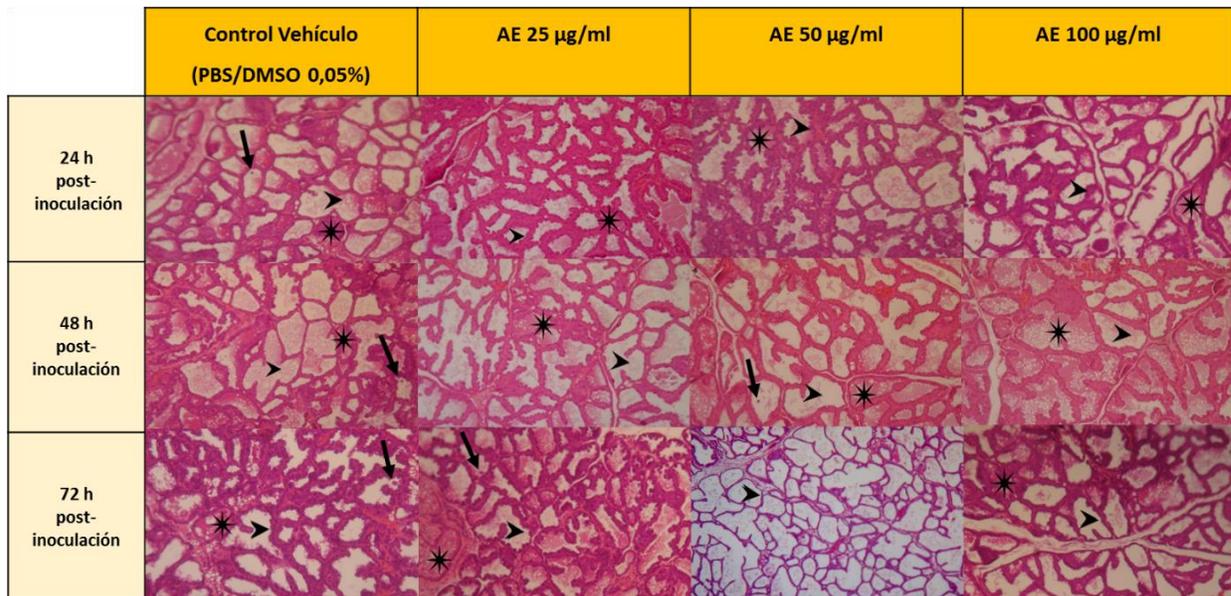


Figura 28: Histopatología de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo) y AE (25, 50 y 100 µg/ml), a distintos tiempos post-inoculación. La flecha indica PMNs, la estrella secreción láctea y la punta de flecha, un alveolo. Secciones representativas del tejido mamario. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio. Magnificación 20X.

El análisis histopatológico de las glándulas mamarias del grupo control no reveló alteraciones en la estructura del tejido mamario tales como pérdida de la integridad alveolar, ni tampoco se observó infiltración de PMNs en los distintos tiempos ensayados. La secreción láctea se encontró dentro de los parámetros normales. El tratamiento con AE no alteró el tejido mamario ni provocó inflamación independientemente de la dosis o tiempo ensayados. La secreción láctea observada fue similar al grupo control (**figura 28**).

En la bibliografía no se describen estudios referidos a los efectos del AE de *M. verticillata* en glándula mamaria bovina o murina, siendo éste el primer trabajo en esta temática. Sin embargo, Silvestrini *et al.* (2017) demostraron que una sola aplicación de diferentes concentraciones del extracto de *Panax ginseng* (3, 10 y 50 mg/ml) no afectó la arquitectura del tejido mamario pero provocó una leve a moderada infiltración de PMNs macrófagos y linfocitos a partir de las 24 h post-inoculación. Estos resultados concuerdan en parte con los obtenidos en el presente trabajo porque una sola aplicación de AE de *M. verticillata* no afectó la arquitectura de la glándula mamaria ni produjo la infiltración de PMNs.

Los ensayos *in vitro* sobre células de glándula mamaria bovina e *in vivo* sobre glándula mamaria de ratones Balb/c hembras en período de lactancia realizados en el presente trabajo, permitieron determinar la inocuidad del AE sobre este tipo de células y demostraron que una sola aplicación de esta fracción vegetal no generó una respuesta inflamatoria en el tejido mamario ni cambios en la estructura de la glándula mamaria, independientemente de la dosis empleada.

5.3.1.3. Evaluación de la dosis inmunoestimulante del aceite esencial de *M. verticillata* en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras

En la **figura 29** se resume el resultado de la infiltración de PMNs obtenido luego del análisis histopatológico de las glándulas mamarias que recibieron dos aplicaciones de AE (25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) 24 h post-inoculación.

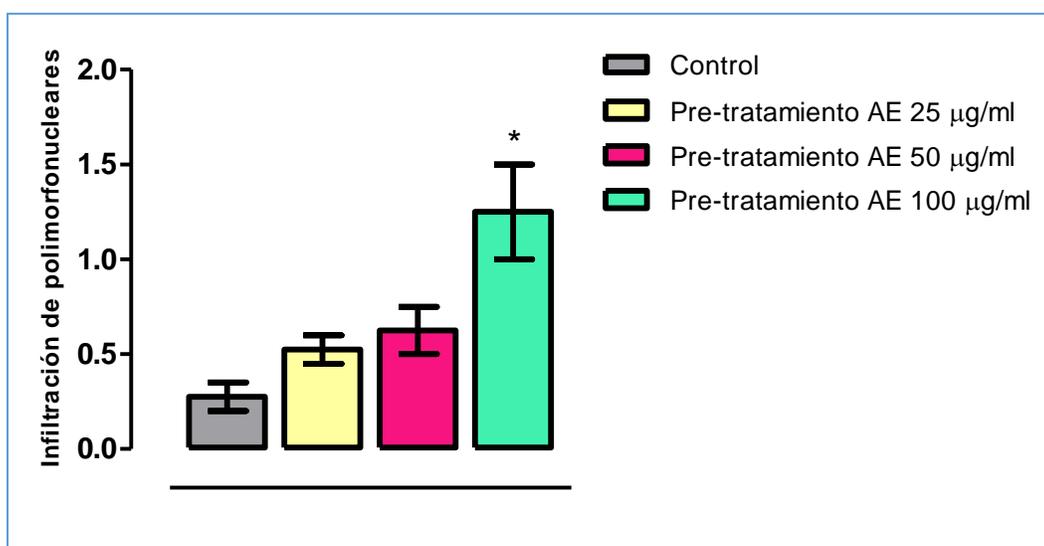


Figura 29: Infiltración de PMNs en glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con dos aplicaciones de AE (25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$), 24 h post-inoculación. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio. A la presencia de PMNs en el tejido mamario se le asignó una puntuación.

0: sin infiltración de PMNs, 1: leve infiltración de PMNs, 2: moderada infiltración de PMNs 3: intensa infiltración de PMNs y cambios severos en el tejido glandular.

* $p < 0,05$ diferencia significativa respecto a la infiltración observada en las glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control).

El análisis histopatológico de las glándulas mamarias reveló que las dos aplicaciones de AE (25 y 50 $\mu\text{g/ml}$) no incrementaron el número de PMNs a las 24 h post-inoculación. Sin embargo, las dos aplicaciones de AE (100 $\mu\text{g/ml}$) produjeron un aumento significativo de PMNs comparado con el grupo control ($p < 0,05$) (**figura 29**). Considerando este resultado, en la **figura 30** se muestra una microfotografía representativa del análisis histopatológico de las glándulas mamarias de los ratones inoculados con dos aplicaciones de la dosis de AE 100 $\mu\text{g/ml}$ donde se observa una leve infiltración de PMNs.

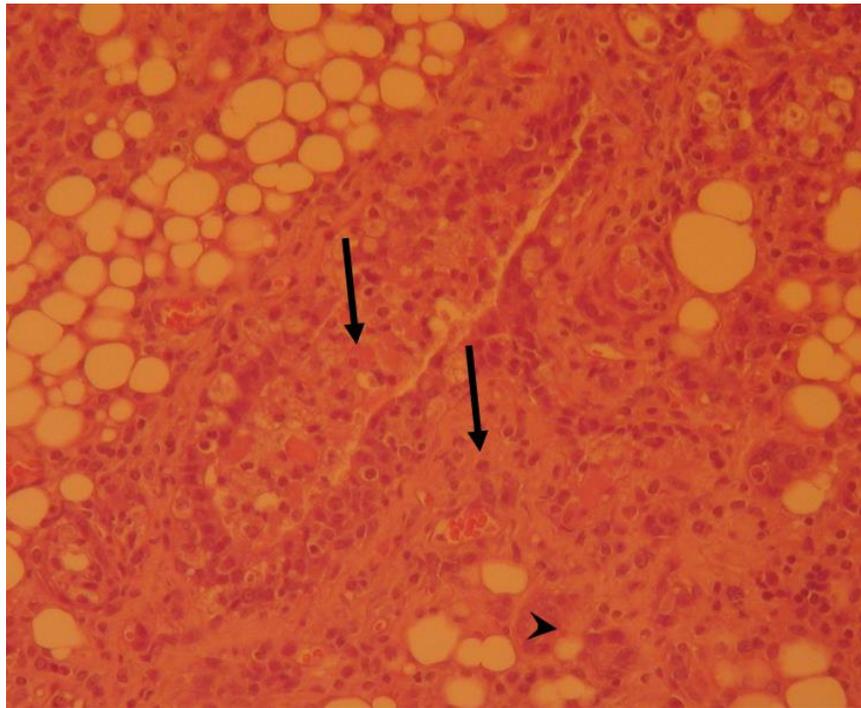


Figura 30: Histopatología de glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculada con dos aplicaciones de AE (100 $\mu\text{g/ml}$), 24 h post-inoculación. La flecha indica PMNs y la punta de flecha, un alveolo. Sección representativa del tejido mamario. $n = 2$ animales por grupo y por tiempo de sacrificio. Magnificación 20X.

Mediante este ensayo se observó que la aplicación de dos dosis de AE (100 $\mu\text{g/ml}$) incrementó el número de PMNs. Este resultado sugiere que AE fue reconocido por las células de la inmunidad innata presentes en la glándula mamaria murina y se despertó una respuesta inflamatoria con reclutamiento de PMNs al sitio de inoculación. Debido a esto, ésta dosis fue elegida para caracterizar el potencial inmunomodulador de AE en el modelo murino de infección desarrollado en el presente trabajo.

5.3.2. Efecto de la dosis y tiempo de exposición de la cepa *E. faecium* EF214 mediante inoculación intramamaria en ratones Balb/c hembras

5.3.2.1. Examinación macroscópica post-mortem de las glándulas mamarias inoculadas con la cepa *E. faecium* EF214

En la **figura 31** se observan fotografías de las glándulas mamarias de los animales que recibieron distintas suspensiones de la cepa EF214 a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación.



Figura 31: Fotografías representativas de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo) y la cepa EF214 (1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 o 1×10^8 UFC/ml) a distintos tiempos post-inoculación. Se observan alteraciones macroscópicas en las glándulas inoculadas con la cepa EF214 (1×10^5 , 1×10^7 o 1×10^8 UFC/ml), a todos los tiempos evaluados. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio.

Las glándulas mamarias de los animales del grupo control no presentaron alteraciones macroscópicas en los diferentes tiempos ensayados. En las glándulas mamarias inoculadas con la cepa EF214 1×10^3 UFC/ml tampoco se observaron alteraciones macroscópicas para los distintos tiempos evaluados. Sin embargo, las glándulas que fueron inoculadas con concentraciones mayores de la cepa (1×10^5 , 1×10^7 o 1×10^8 UFC/ml) presentaron diferencias en su coloración respecto a las del grupo control. En la **figura 32**, se observa tamaño y peso promedio de las glándulas mamarias inoculadas con el microorganismo.

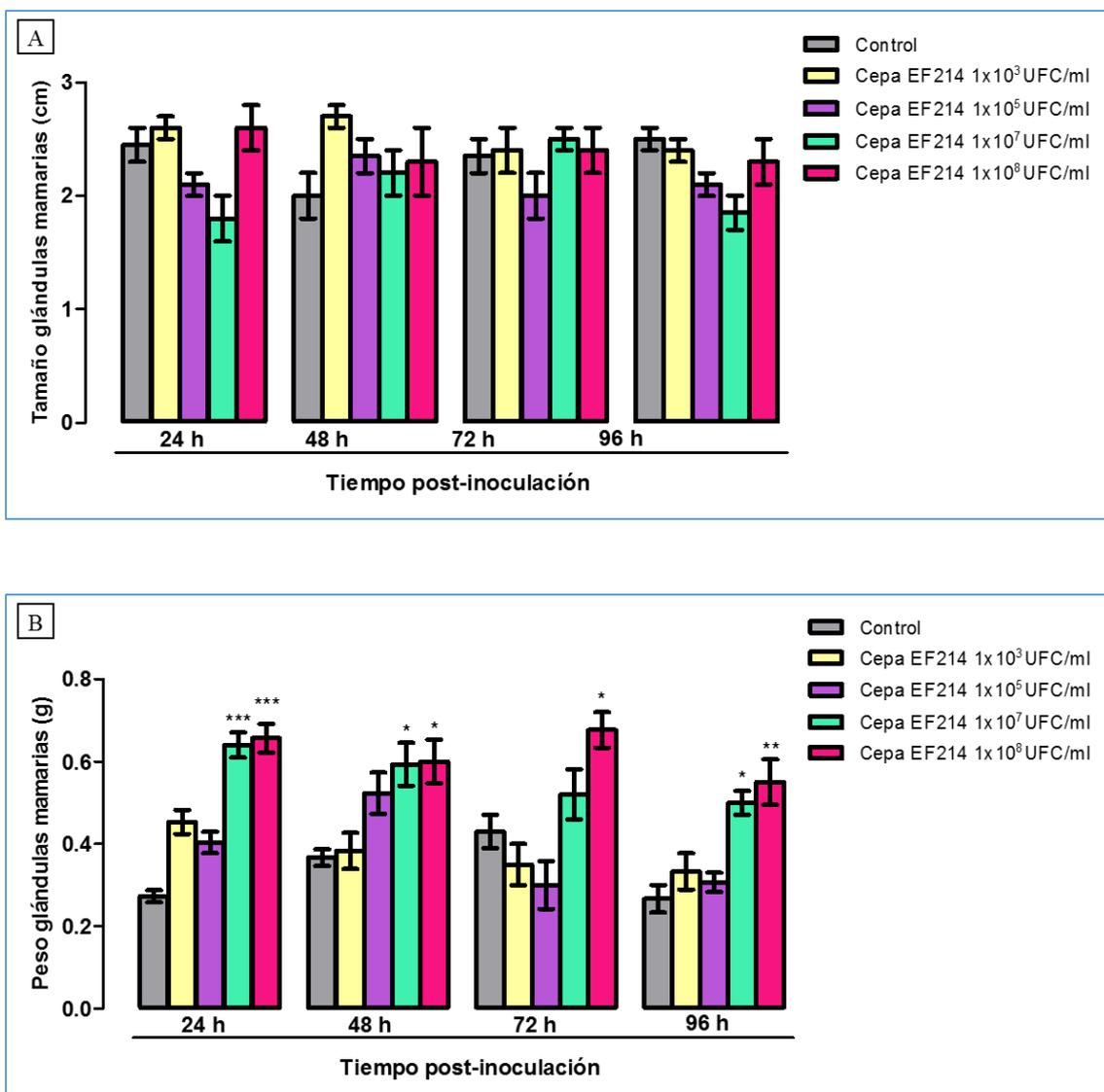


Figura 32: A) tamaño y B) peso de las glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con diferentes suspensiones de la cepa EF214, a distintos tiempos post-inoculación. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio

No se observaron variaciones significativas en el tamaño de las glándulas mamarias que recibieron las diferentes suspensiones de la cepa EF214 (**figura 32 A**).

El peso de las glándulas mamarias inoculadas con la cepa EF214 1×10^3 y 1×10^5 UFC/ml se mantuvo sin cambios respecto al grupo control. Sin embargo, las glándulas inoculadas con 1×10^7 UFC/ml mostraron incremento en su peso a las 24, 48 y 96 h post-inoculación respecto al grupo control ($p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,05$, respectivamente). También se observó incremento significativo en el peso de las glándulas inoculadas con 1×10^8 a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación comparado con el grupo control ($p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente) (**figura 32 B**).

Estos resultados demostraron que el aumento de peso registrado en las glándulas inoculadas con las dosis más altas de la cepa EF214 estaría relacionado a la inflamación generada por la infección.

5.3.2.2. Examinación histopatológica de las glándulas mamarias inoculadas con la cepa *E. faecium* EF214

En la **figura 33** se muestran microfotografías del análisis histopatológico realizado a las glándulas mamarias de los ratones inoculados con la cepa EF214.

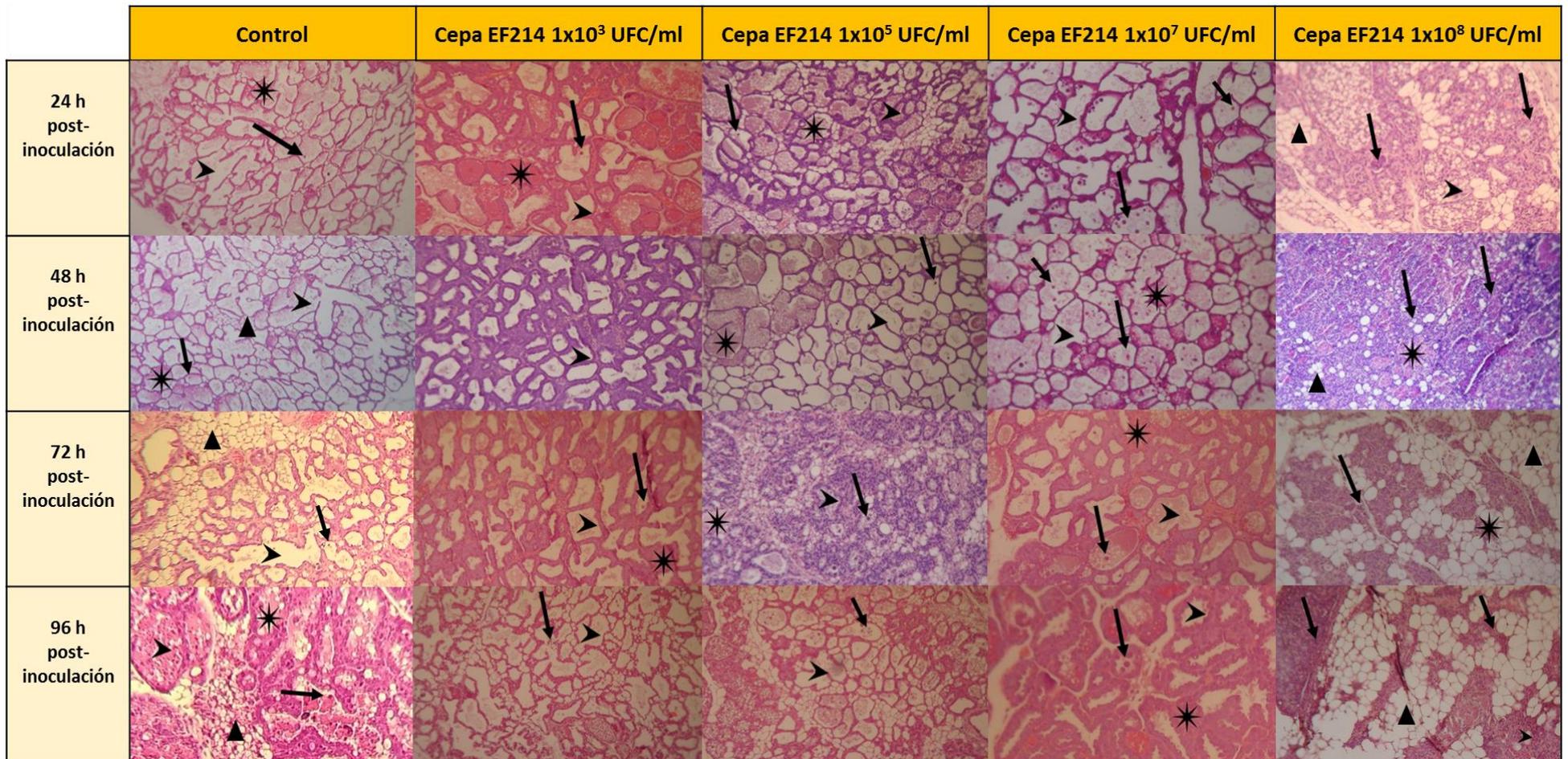


Figura 33: Histopatología de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo) y la cepa EF214 (1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 o 1×10^8 UFC/ml) a distintos tiempos post-inoculación. La flecha indica PMNs, la estrella secreción láctea, la punta de flecha, un alveolo y el triángulo, adipocitos. Nota: Obsérvese la sustitución paulatina del tejido mamario por adipocitos a medida que transcurren las horas post-inoculación en el grupo control y principalmente en las glándulas inoculadas con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml). Secciones representativas del tejido mamario. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio. Magnificación 10X.

El análisis histopatológico de las glándulas mamarias del grupo control no mostró alteraciones en la estructura del tejido mamario, como pérdida de la integridad alveolar, ni tampoco se observó infiltración de PMNs a los distintos tiempos ensayados. La secreción láctea estuvo dentro de los parámetros normales (**figura 33**).

En la **figura 34** se resume el resultado de la infiltración de PMNs en glándulas mamarias inoculadas con las diferentes suspensiones de la cepa EF214.

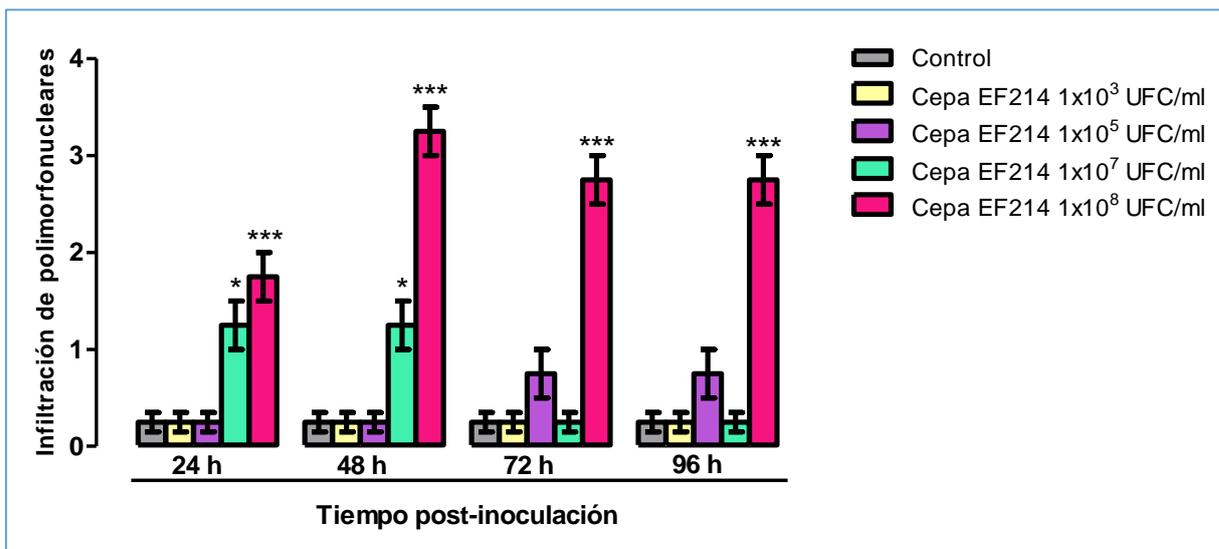


Figura 34: Infiltración de PMNs en glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con diferentes suspensiones de la cepa EF214, a distintos tiempos post-inoculación. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio. A la presencia de PMNs en el tejido mamario se le asignó una puntuación.

0: sin infiltración de PMNs, 1: leve infiltración de PMNs, 2: moderada infiltración de PMNs 3: intensa infiltración de PMNs y cambios severos en el tejido glandular.

*p<0,05 y ***p<0,001 diferencias significativas respecto a la infiltración observada en las glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control).

La inoculación con dos suspensiones de la cepa EF214 (1x10³ y 1x10⁵ UFC/ml) no reveló cambios estructurales (**figura 33**) ni mostró diferencias en cuanto a la infiltración de PMNs respecto al grupo control en los tiempos evaluados (24, 48, 72 y 96 h) (**figura 34**).

La IIM con la cepa EF214 (1x10⁷ UFC/ml), mostró una leve infiltración de PMNs a las 24,48, 72 y 96 h post-inoculación, la cual fue significativa con respecto al control (p<0,05) (**figuras 33 y 34**).

La inoculación con EF214 (1x10⁸ UFC/ml), reveló una infiltración de PMNs que fue desde moderada a intensa a medida que transcurrieron las horas post-inoculación. Se observaron diferencias estadísticas significativas respecto al el grupo control (p<0,001)

(**figuras 33 y 34**). Es importante destacar que a las 96 h post-inoculación la infiltración celular fue de tipo mixta, debido a que no solo se observó abundante infiltración de PMNs, sino que también se evidenció, aunque en menor proporción, la presencia macrófagos y linfocitos. Además, se observó pérdida de la integridad e individualidad alveolar a las primeras horas y en las últimas horas se pudieron visualizar paredes alveolares engrosadas y una fuerte hiperemia (**figura 33**).

Por otro lado, en las glándulas mamarias del grupo control se observó la presencia de adipocitos a partir de las 72 h post-inoculación. Sin embargo, a las 24 y 48 h no se observaron adipocitos. Estas variaciones en cuanto a la presencia o ausencia de adipocitos en las glándulas mamarias de los individuos de un mismo grupo e incluso en las glándulas de un mismo individuo podría deberse a que la involución de la glándula mamaria en el ratón comienza cuando las crías dejan de succionar. En la involución natural, las crías continúan mamando intermitentemente a medida que pasan a una dieta sólida. Por lo tanto, la remodelación de la glándula mamaria, donde una gran proporción del epitelio mamario sufre una muerte celular programada y es sustituido progresivamente por adipocitos, se realiza de forma no sincronizada en diferentes áreas de la glándula que sufren involución a diferentes tiempos (Atabai *et al.*, 2007) (**figura 33**).

Si bien se observaron adipocitos en el tejido mamario de los ratones del grupo control, es importante destacar el incremento de los mismos en las glándulas mamarias inoculadas con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) (**figura 33**). Esto podría deberse a que el tejido adiposo de la glándula mamaria puede retroceder y expandirse dinámicamente en respuesta a diversos estímulos y escenarios fisiológicos, incluidos una infección bacteriana (Zwick *et al.*, 2018).

Diferentes autores han definido a la mastitis como la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria asociada generalmente con la presencia de un agente infeccioso y caracterizado por la infiltración de células somáticas principalmente PMNs (Kerr y Wellnitz, 2003; Bannerman *et al.*, 2004a; Hansen *et al.*, 2004).

El análisis histopatológico reveló que la inoculación de la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) activó mecanismos efectores de la inmunidad innata evidenciados por la inflamación de la glándula mamaria de los ratones inoculados, con una infiltración moderada o intensa de PMNs en todos los tiempos ensayados. Además, la presencia de linfocitos en el tejido mamario a las 96 h post-infección estaría indicando la activación del sistema de

defensas de la inmunidad adaptativa, sugiriendo que el patógeno ha sido capaz de evadir o no ha sido completamente eliminado por el sistema de defensas innata (Sordillo y Streicher, 2002). En resumen, los resultados obtenidos demostraron que la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) indujo mastitis en los ratones Balb/c hembras en período de lactancia.

Si bien en la bibliografía consultada se describen ensayos con *E. faecium* en modelos murinos para el estudio de terapia antibacteriana para tratar enfermedades humanas o para el estudio de diferentes genes asociados a la virulencia de este microorganismo (Alder *et al.*, 2003; Sillanpää *et al.*, 2010), no se encontraron trabajos que describan una inducción de mastitis con *E. faecium* en modelo murino. Sin embargo, Petersson-Wolfe *et al.* (2009) luego de la IIM en vacas Holstein lactantes de *E. faecium* (1×10^4 UFC/ml) observaron un aumento en el recuento de células somáticas (principalmente PMNs) en leche a partir de las 72 h post-inoculación, lo que es indicativo de una infección intramamaria. Estos resultados tienen similitud con los obtenidos en el presente estudio en donde la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) también fue capaz de incrementar el número de PMNs en glándula mamaria de ratón.

Rowson *et al.* (2010) y Trigo *et al.* (2009) investigaron los cambios histopatológicos en el tejido mamario de ratones luego de la inoculación intramamaria de *S. uberis* (50 UFC/ml) y *S. agalactiae* (1×10^8 UFC/ml), respectivamente, y observaron una masiva infiltración de PMNs junto a la pérdida de la integridad del tejido mamario respecto al grupo control. Estos resultados coinciden con los observados en el presente trabajo debido a que mediante la inoculación intramamaria de la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) se logró una respuesta inflamatoria en la glándula mamaria de ratones Balb/c. Si bien *E. faecium* y *S. uberis* son considerados patógenos ambientales mientras que *S. agalactiae* es un patógeno contagioso causante de mastitis, es importante destacar que estos microorganismos están taxonómicamente relacionados.

5.3.2.3. Recuento bacteriano a partir de homogenatos de glándula mamaria inoculadas con la cepa *E. faecium* EF214

En la **figura 35** se muestra el recuento de bacterias realizado a partir de los homogenatos de glándula mamaria de los ratones inoculados con diferentes suspensiones de la cepa EF214 a distintos tiempos post-inoculación.

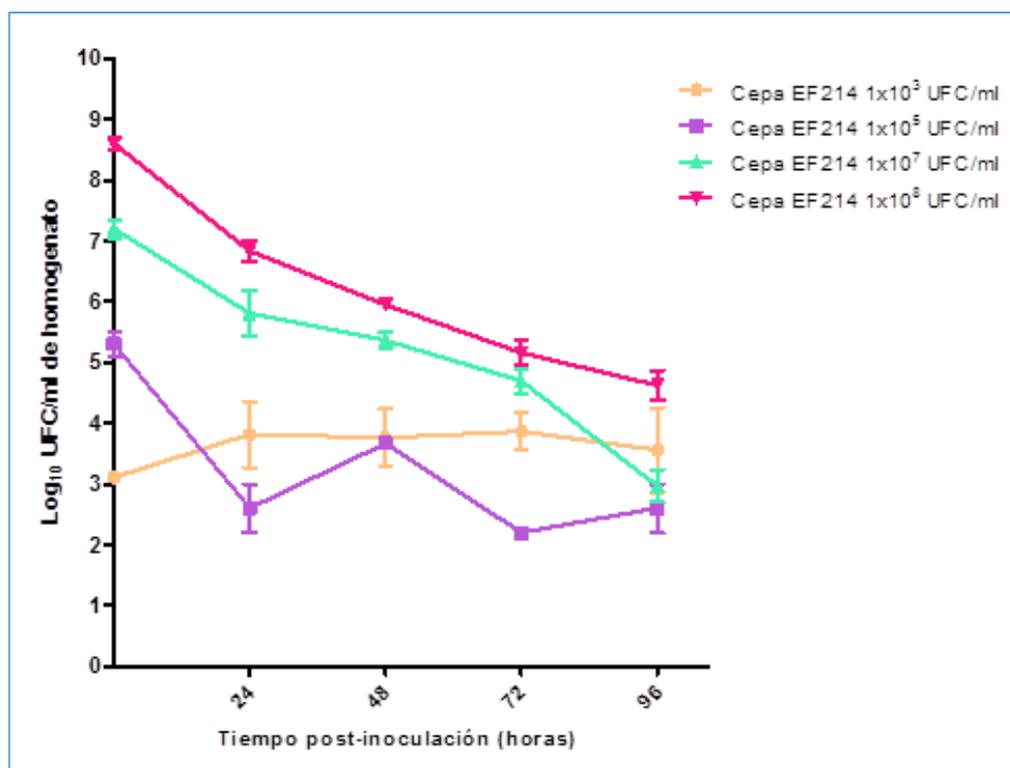


Figura 35: Recuento bacteriano en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculados con diferentes suspensiones de la cepa EF214, a distintos tiempos post-inoculación. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio.

El recuento bacteriano en los homogenatos de las glándulas mamarias inoculadas con la cepa EF214 (1×10^3 UFC/ml), mostró un incremento no significativo 24 h post-inoculación, manteniéndose la carga bacteriana estable hasta las 96 h.

La IIM con la cepa EF214 (1×10^5 UFC/ml), mostró una fuerte disminución en el recuento bacteriano a las 24 h ($p < 0,001$ respecto al inoculo inicial) seguido por un incremento a las 48 h ($p < 0,01$ respecto al inóculo inicial). A las 72 h se observó una disminución significativa de la carga bacteriana ($p < 0,001$ respecto al inoculo inicial) seguida por un ligero incremento a las 96 h.

Luego de la IIM con la cepa EF214 (1×10^7 UFC/ml), se observó una disminución continua en el recuento bacteriano a las 24, 48, 72 y 96 h ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente).

La IIM con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) mostró una disminución gradual de la carga bacteriana respecto al inoculo inicial desde las 24 hasta las 96 h post-inoculación ($p < 0,001$) (**figura 35**). Este resultado se relaciona con la intensa inflamación observada en el análisis histopatológico de las glándulas mamarias del mismo grupo de ratones lo que

demuestra claramente que el patógeno no logró ser eliminado por las células efectoras del sistema inmune innato (PMNs y macrófagos) lo que llevó a la activación de los mecanismos de defensas de la inmunidad adaptativa evidenciados por la presencia de linfocitos en el tejido mamario a las 96 h post-infección (**figura 33**).

Las bacterias ambientales, como los estreptococos y los enterococos, son agentes importantes asociados a la mastitis bovina. Los enterococos son parte de la microbiota de los sistemas gastrointestinal y urogenital de los mamíferos. Además ocupan una gran variedad de nichos que forman parte del medio ambiente que está en contacto con la vaca, lo que es fundamental para que este microorganismo cause la enfermedad (Smith y Hogan, 2003). Las especies de *Enterococcus* que se aíslan con mayor frecuencia de vacas con mastitis son *E. faecium* y *E. faecalis* (Smith y Hogan, 2003; Carrillo-Casas y Miranda-Morales, 2012).

A pesar de las diferencias en cuanto al patógeno, inóculo inicial y cepa de ratones evaluados, los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan en parte con los informados por distintos autores, los cuales han desarrollado mastitis por diferentes patógenos en un modelo murino (Rowson *et al.*, 2010; Forsberg *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015 y Silvestrini *et al.*, 2017). En estos estudios se ha demostrado que luego de la IIM del patógeno se observa una disminución de la carga bacteriana en las primeras 48 h y un ligero incremento a las 72 h, que se mantiene estable a lo largo de los diferentes tiempos evaluados. Por otra parte, Trigo *et al.* (2009), observaron que la carga bacteriana de ratones Balb/c inoculados por vía intramamaria con la cepa *S. agalactiae* BA64 (1×10^8 UFC/ml) aislada de vacas con mastitis, aumentó significativamente en las primeras 24 h post-inoculación seguido por una disminución gradual, casi total, hasta las 360 h (15 días) post-inoculación. Este resultado no concuerda con lo observado en el presente estudio donde la carga bacteriana disminuyó gradualmente hasta las 96 h post-inoculación se demostró en ensayos posteriores que se mantuvo estable hasta las 360 h (15 días) (**figura 41**) lo que evidencia la capacidad de la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) para establecerse en el tejido mamario.

Las variaciones encontradas en las distintas investigaciones, podrían deberse a los microorganismos utilizados, sus factores de virulencia y las concentraciones empleadas. Otro factor a tener en cuenta es que el grado de infección experimental de los patógenos ambientales como estreptococos y enterococos es muy variable y más bajo respecto al de los patógenos contagiosos como los estafilococos. También es importante destacar, que las

diferentes cepas de ratones utilizadas en los diversos estudios podrían ser más o menos susceptibles frente a la infección por el patógeno, presentando incluso diferencias entre los animales de la misma cepa (Chandler, 1970).

5.3.2.4. Recuperación de bacterias de hígado, riñones y sangre de ratones Balb/c hembras inoculados con la cepa *E. faecium* EF214

A partir de las improntas en ATS de hígado y riñones de los ratones inoculados con las distintas suspensiones de la cepa EF214 (1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 y 1×10^8 UFC/ml) se pudieron observar colonias presuntivas de *E. faecium* en todos los tiempos ensayados. Posteriormente, la coloración de Gram y la prueba de catalasa revelaron la presencia de cocos Gram positivos y catalasa negativa. Estos resultados confirmaron que se aisló el microorganismo que fue inoculado, y que el mismo tiene capacidad de diseminar desde las glándulas mamarias a hígado y riñón.

No se recuperaron bacterias de las muestras de sangre de los ratones que recibieron las suspensiones de la cepa EF214 (1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 UFC/ml). Sin embargo fue posible aislar bacterias de las muestras de sangre de los ratones que recibieron por IIM una suspensión de 1×10^8 UFC/ml de este microorganismo.

En el presente trabajo, se logró recuperar la cepa EF214 de hígado, riñones y sangre de los ratones inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml). Estos resultados concuerdan con los informados por otros autores quienes luego de la IIM en un modelo murino de diferentes patógenos causantes de mastitis, lograron aislar el microorganismo en hígado, riñones y sangre demostrando la capacidad de estos patógenos de difundir desde la glándula mamaria hacia los diferentes órganos luego de la IIM (Brouillette *et al.*, 2004; Trigo *et al.*, 2009; Rowson *et al.*, 2010; Forsberg *et al.*, 2012).

5.3.2.5. Caracterización molecular de las cepas aisladas post-inoculación

En la **figura 36** se muestra la imagen de los productos obtenidos por RAPD-PCR en un gel de agarosa al 1,2%.

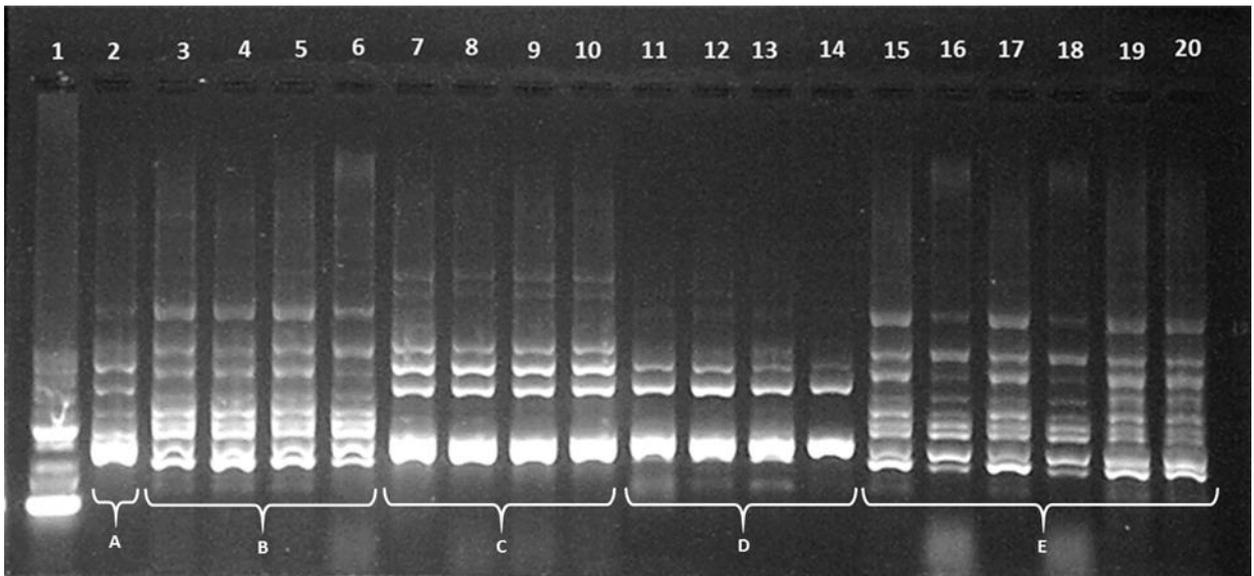


Figura 36: Productos de RAPD-PCR en gel de agarosa al 1,2%. Cepas recuperadas a partir de glándula mamaria y de los diferentes órganos de ratones inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml). **Línea 1:** marcador de peso molecular de 100pb. **Línea 2:** cepa EF214 inoculada (perfil de bandas A). **Líneas 3 a 6:** perfil de bandas B generado por cepas recuperadas de GMR4^a, GML4^b, hígado y riñones 24 h post-inoculación respectivamente. **Líneas 7 a 10:** perfil de bandas C, dado por cepas recuperadas de GMR4, GML4, hígado y riñones 48 h post-inoculación respectivamente. **Líneas 11 a 14:** perfil D cepas recuperadas de GMR4, GML4, hígado y riñones 72 h post-inoculación respectivamente. **Líneas 15 a 18:** perfil de bandas E, cepas recuperadas de GMR4, GML4, hígado y riñones 96 h post-inoculación respectivamente. **Líneas 19 y 20:** perfil de bandas E, cepas recuperadas de GMR4, GML4 15 días post-inoculación respectivamente.

^aGMR4: glándula mamaria abdominal derecha. ^bGML4: glándula mamaria abdominal izquierda

En la **figura 36** pueden observarse 5 perfiles de bandas (A - E). El perfil A corresponde a la cepa original EF214 y los perfiles B (líneas 3 a 6), C (líneas 7 a 10) y D (líneas 11 a 14) corresponden a las cepas recuperadas de glándula mamaria y de los diferentes órganos a las 24, 48 y 72 h, respectivamente. El perfil E (líneas 15 a 20) corresponde a las cepas recuperadas de glándula mamaria y de los diferentes órganos a las 96 y 360 h (15 días) post-inoculación.

La presencia de un perfil de bandas diferentes, según tiempo de aislamiento, nos permite concluir que el perfil genético de las cepas recuperadas de glándula mamaria y órganos es diferente en cada uno de los tiempos ensayados. Asimismo, el perfil genético de la cepa inoculada (línea 2) fue cambiando a lo largo del tiempo.

En la bibliografía consultada no se describen estudios referidos a la caracterización molecular de las bacterias recuperadas a partir de glándula mamaria de ratones inoculados con *E faecium*. Sin embargo, Khazandi *et al.* (2015) y Quesnell *et al.* (2012), quienes

utilizaron un modelo bovino de mastitis por *S. uberis* y *E. coli*, respectivamente, demostraron que el perfil de bandas obtenido para las cepas aisladas, fue idéntico al perfil de bandas de la cepa inoculada a las 48 y 96 h post-desafío. Lo descrito por estos autores no concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se observa que el perfil genético de la cepa inoculada va cambiando a lo largo del tiempo en el que se desarrolló el ensayo *in vivo*. Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que el género *Enterococcus* se caracteriza por su elevada capacidad de adquirir material genético externo por conjugación, por transferencia de plásmidos o transposones (Johnston y Jaykus, 2004; Albornoz *et al.*, 2005). Los enterococos intercambian genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia entre miembros de su género y con cepas de otros géneros incluyendo bacterias Gram negativas y Gram positivas. Estos procesos tienen lugar mediante mecanismos de transferencia génica altamente eficientes (Clewell, 1990; Huycke *et al.*, 1992; Gilmore *et al.*, 1994; Mundy *et al.*, 2000; Herráez, 2008).

5.3.3. Evaluación del efecto inmunomodulador del aceite esencial de *M. verticillata* en un modelo murino de mastitis

5.3.3.1. Examinación macroscópica post-mortem de las glándulas mamarias pre-tratadas con aceite esencial de *M. verticillata* y desafiadas con la cepa *E. faecium* EF214

En la **figura 37**, se observan fotografías de las glándulas mamarias de los ratones de los grupos control vehículo, cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratamiento con AE y desafío a las 24, 48, 72, 96 y 360 h (15 días) post-inoculación.

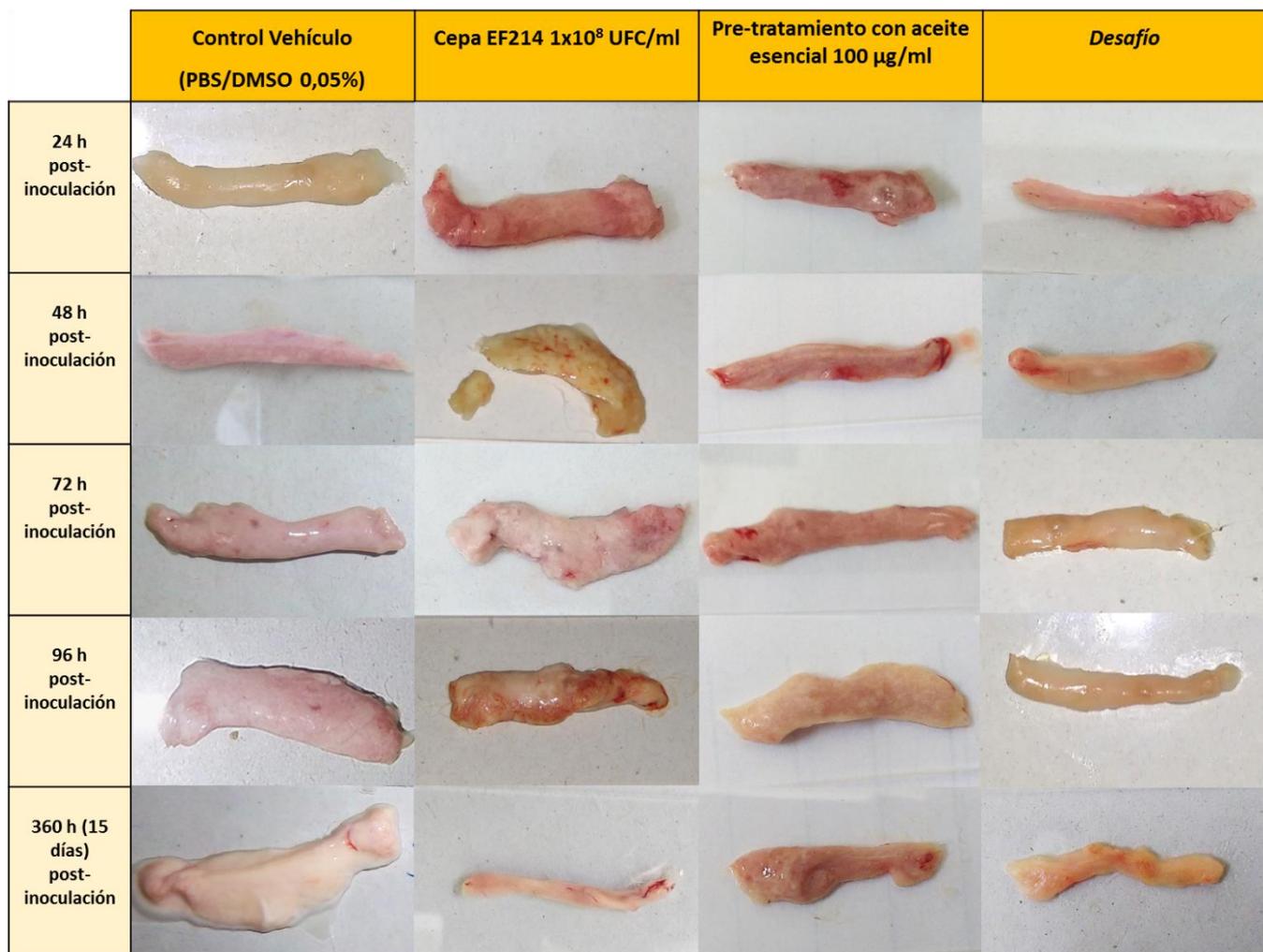


Figura 37: Fotografías representativas de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 μ g/ml) y del grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214), a distintos tiempos post-inoculación. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio.

Las glándulas mamarias que recibieron el pre-tratamiento con AE (100 μ g/ml) a las 24, 48, 72 y 360 h presentaron un pequeño cambio en cuanto a su coloración con respecto a las glándulas del grupo control. Esta variación observada en algunos tiempos podría atribuirse a un leve proceso inflamatorio desencadenando por el reconocimiento de los compuestos presentes en el AE por parte de diferentes células efectoras de la inmunidad innata. Por otro lado, las glándulas mamarias de los animales del grupo desafío, las cuales recibieron un pre-tratamiento con dos aplicaciones de AE (100 μ g/ml) y luego fueron desafiadas con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), presentaron una notable mejoría en cuanto a su coloración respecto a las glándulas infectadas (**figura 37**).

En las **figura 38** se muestra el tamaño y el peso de las glándulas mamarias de los animales de los grupos, cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratamiento con AE y desafío.

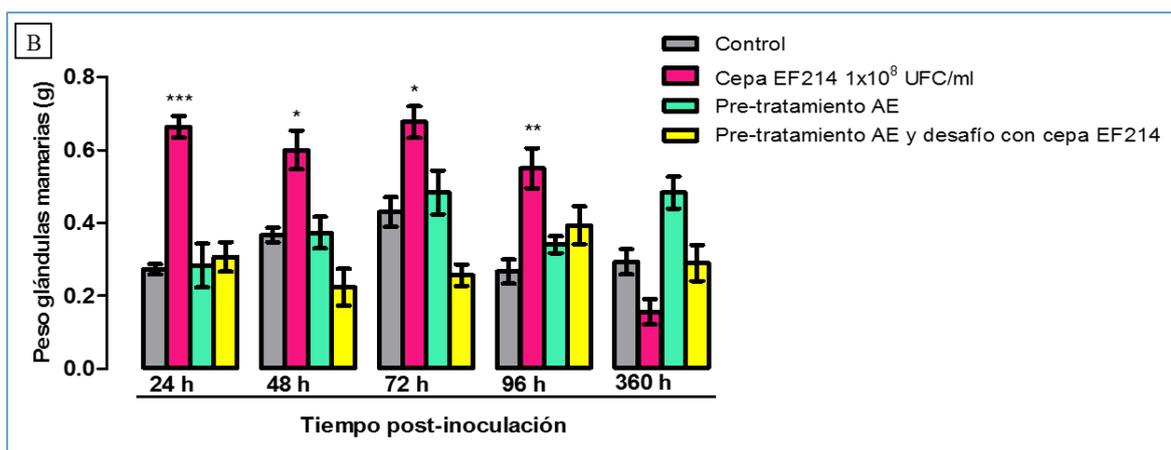
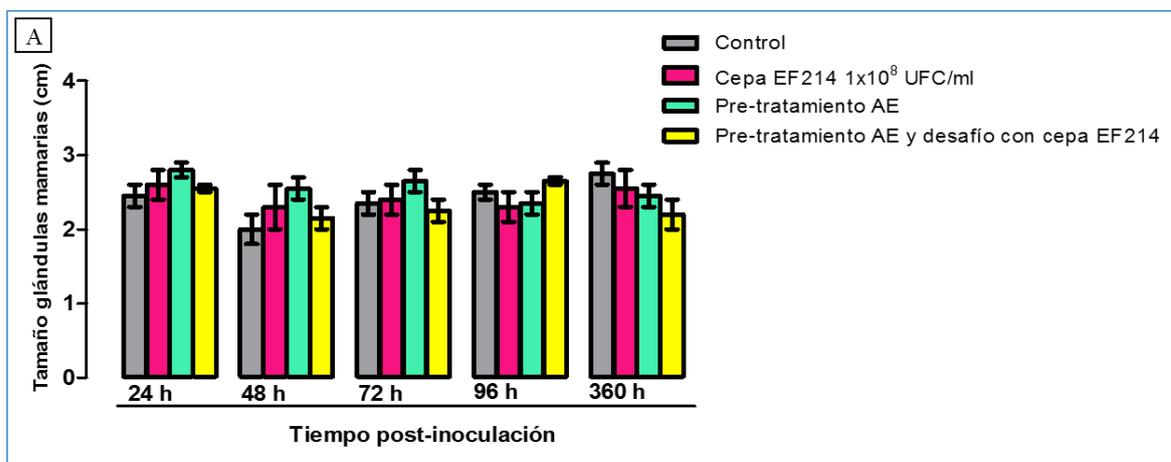


Figura 38: A) Tamaño y B) peso de las glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 μ g/ml) y del grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214), a distintos tiempos post-inoculación. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativas respecto al grupo control (PBS/DMSO 0,05%).

Como se observa en la **figura 38 A** ningún tratamiento afectó el tamaño de las glándulas mamarias, comparado con el control. Por otro lado, sólo las glándulas que fueron inoculadas con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) presentaron un incremento en su peso comparado con el control, a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación ($p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente) (**figura 38 B**), lo cual estaría relacionado al proceso inflamatorio generado durante la infección (**figuras 33 y 34**).

5.3.3.2. Examinación histopatológica de las glándulas mamarias pre-tratadas con aceite esencial de *M. verticillata* y desafiadas con la cepa *E. faecium* EF214

En la **figura 39**, se muestran microfotografías del análisis histopatológico realizado a las glándulas mamarias de los ratones de los grupos, cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratamiento con AE y desafío, a las 24, 48, 72, 96 y 360 h (15 días) post-inoculación.

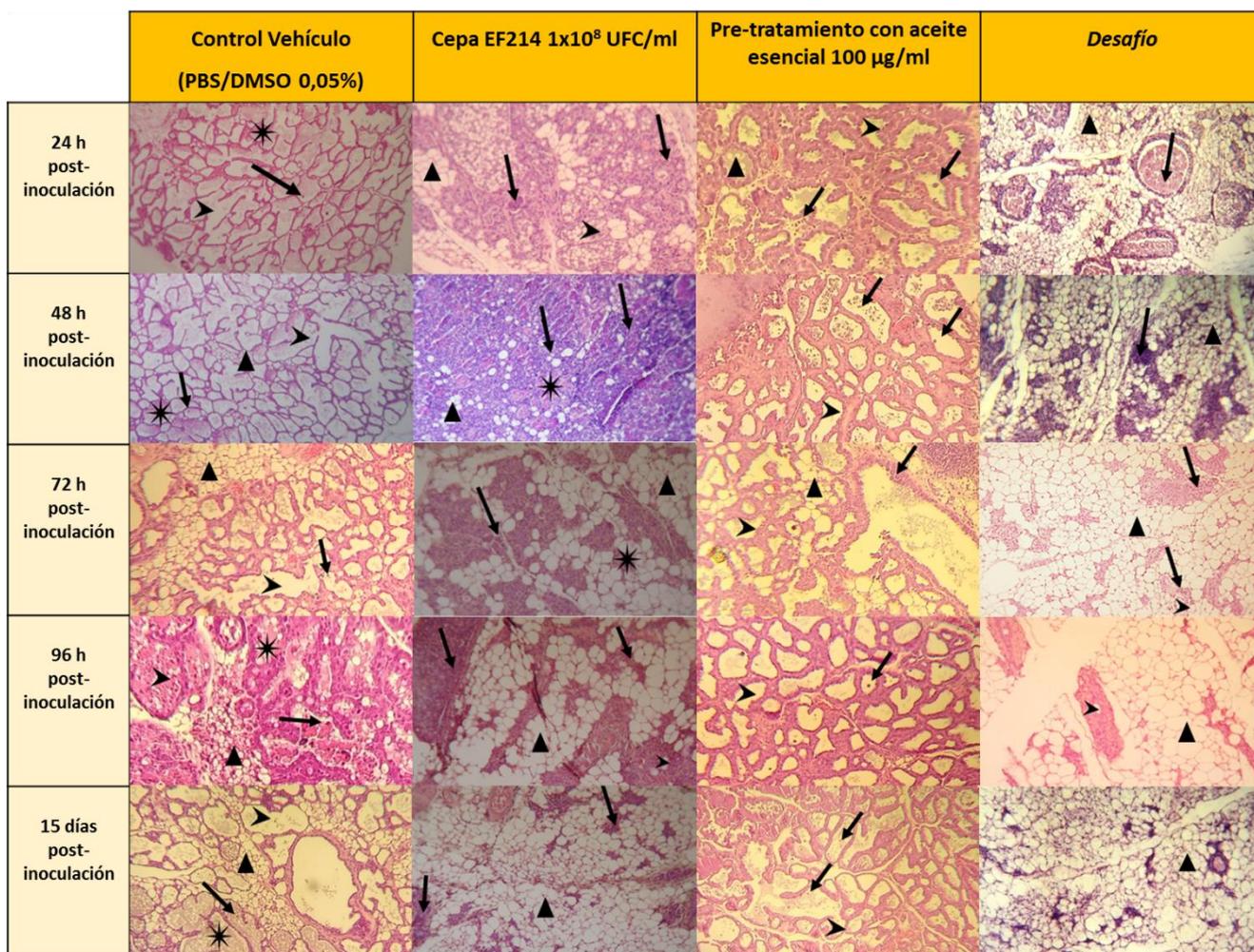


Figura 39: Histopatología de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 $\mu\text{g/ml}$) y del grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214), a distintos tiempos post-inoculación. La flecha indica PMNs, la estrella secreción láctea, la punta de flecha, un alveolo y el triángulo, adipocitos. $n = 2$ animales por grupo y por tiempo de sacrificio. Magnificación 10X.

En la **figura 40** se resume el resultado de la infiltración de PMNs en las glándulas mamarias.

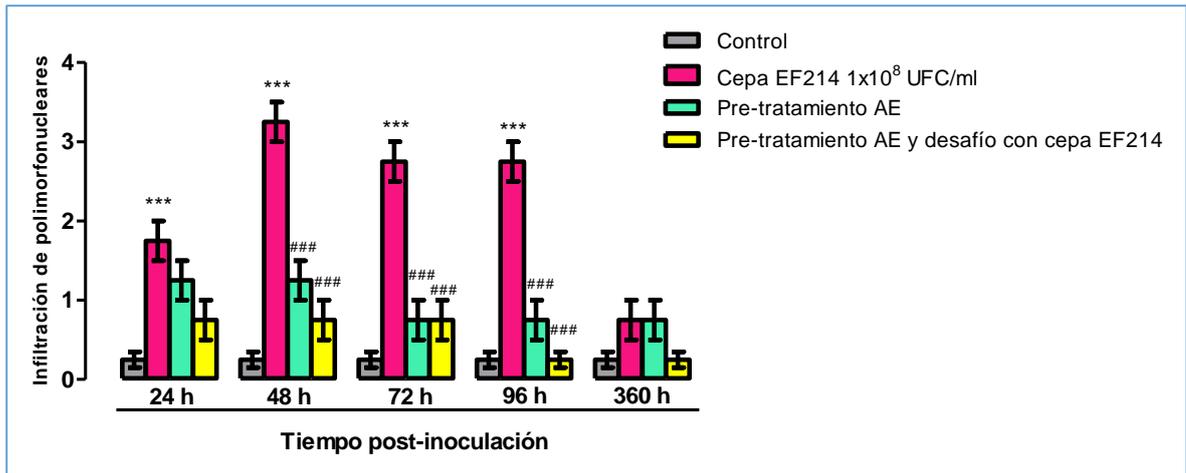


Figura 40: Infiltración de PMNs en glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculadas con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 μ g/ml) y del grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214), a distintos tiempos post-inoculación. n= 2 animales por grupo y por tiempo de sacrificio.

A la presencia de PMNs en el tejido mamario se le asignó una puntuación. 0: sin infiltración de PMNs, 1: leve infiltración de PMNs, 2: moderada infiltración de PMNs 3: intensa infiltración de PMNs y cambios severos en el tejido glandular.

***p<0,001 diferencia significativa respecto al grupo control (PBS/DMSO 0,05%).

###p<0,001 diferencia significativa respecto al grupo EF214 (1×10^8 UFC/ml)

Los resultados de la histopatología mamaria realizada a los animales inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) hasta las 96 h post-inoculación ya fueron expuestos. En la **figura 39** puede observarse una microfotografía representativa del análisis histopatológico de las glándulas mamarias a las 360 h (15 días) post-inoculación que reveló una leve infiltración de PMNs en el tejido glandular, la cual no presentó diferencias con respecto a la infiltración observada en el grupo control (**figura 40**).

El análisis histopatológico de las glándulas mamarias que fueron pre-tratadas con AE (100 μ g/ml), reveló una leve a moderada infiltración de PMNs a todos los tiempos ensayados sin afectar la arquitectura del tejido (**figura 39**). Si bien el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas respecto al grupo control, se observó una clara tendencia al incremento de PMNs en los grupos pre-tratados con AE a todos los tiempos evaluados. Sin embargo, esta infiltración fue significativamente menor respecto a lo observado en el grupo inoculado con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) a las 48, 72 y 96 h post-tratamiento (p<0,001 (**figura 40**)). Este resultado sugiere que el AE estaría modulando la respuesta inmune innata de la glándula mamaria provocando el reclutamiento de PMNs al sitio de inoculación.

El análisis histopatológico del grupo desafío mostró una disminución en la infiltración de PMNs, comparada con el grupo cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) en todos los tiempos ensayados, siendo significativa sólo a las 48, 72 y 96 h ($p < 0,001$). No se observaron diferencias con el grupo control (**figuras 39 y 40**).

La disminución de PMNs en el grupo desafío observada a partir de las 48 h en el análisis histopatológico (**figura 39**), sugiere que los mecanismos de defensa de la inmunidad innata activados por el pre-tratamiento con el AE contribuirían a disminuir la carga bacteriana (**figura 41**).

5.3.3.3 Recuento bacteriano a partir de homogenatos de glándulas mamarias pre-tratadas con aceite esencial de *M. verticillata* y desafiadas con la cepa *E. faecium* EF214

En la **figura 41**, se muestra el recuento bacteriano a partir de homogenatos de glándula mamaria de los ratones pre-tratados con AE y luego desafiados con la cepa EF214 24, 48, 72, 96 h y 360 h (15 días) post-desafío.

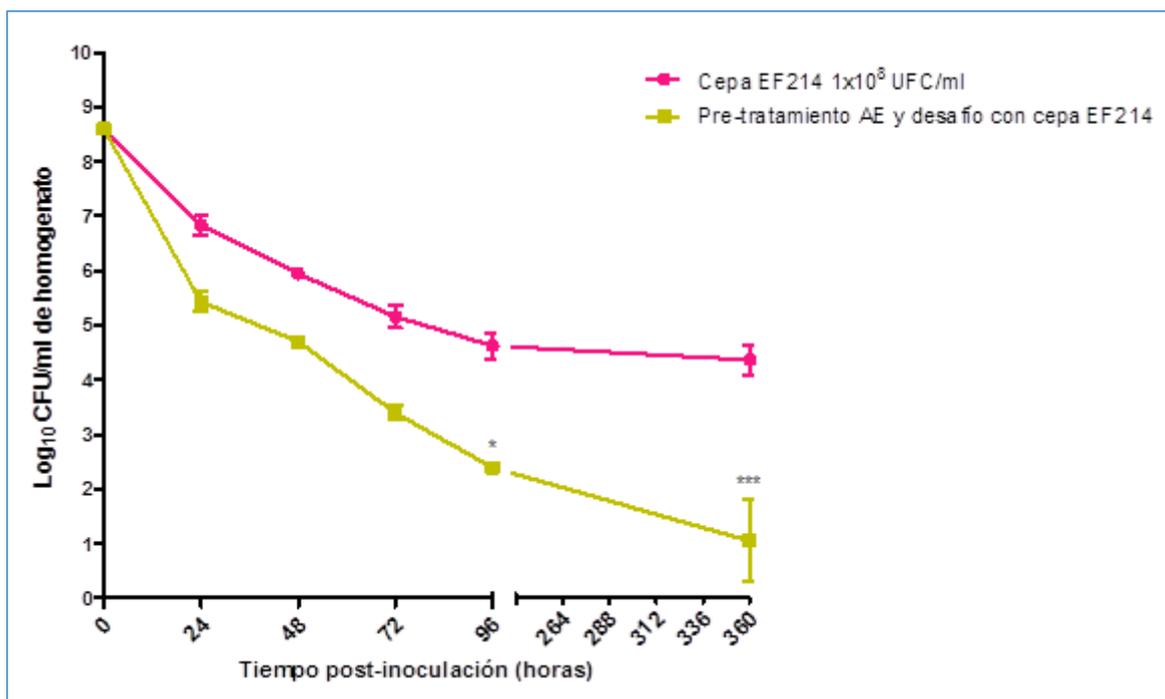


Figura 41: Recuento bacteriano de glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) y del grupo desafío (pre-tratadas con AE y luego desafiadas con la cepa EF214) a distintos tiempos post-inoculación. $n = 2$ animales por grupo y por tiempo de sacrificio.

* $p < 0,05$; y *** $p < 0,001$ diferencias significativas respecto al recuento realizado post-inoculación con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml).

En las glándulas mamarias de los animales del grupo desafío se observó que el recuento bacteriano disminuyó comparado con el grupo inoculado con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml). No se observaron diferencias significativas a las 24, 48 y 72 h, sin embargo, las diferencias fueron marcadas a las 96 y 360 h (15 días) ($p < 0,05$ y $p < 0,001$; respectivamente). La reducción de la carga bacteriana en el grupo desafío se relacionan con la disminución de PMNs observada a partir de las 48 h en el análisis histopatológico (**figuras 39 y 40**), sugiriendo que el AE ejerce un efecto en la glándula mamaria que contribuye a la eliminación del patógeno.

En estudios previos, nuestro grupo de investigación demostró el efecto antibacteriano del AE sobre patógenos de mastitis, incluido *E. faecium* (Cariddi *et al.*, 2013; Montironi *et al.*, 2016b; Cerioli *et al.*, 2018), por lo tanto la disminución de la carga bacteriana en las glándulas mamarias de ratón podría deberse a un efecto antimicrobiano ejercido por este producto vegetal. Sin embargo, en el presente estudio también se demostró el efecto potenciador de la respuesta inmune innata del AE *in vitro* en macrófagos murinos e *in vivo* en la glándula mamaria murina. Teniendo en cuenta lo descrito, es probable que el AE esté ejerciendo un efecto dual (inmunopotenciador/antibacteriano) que lleva a la disminución de la carga bacteriana en la glándula mamaria y a una mejoría del daño causado por la mastitis inducida por *E. faecium*.

Silvestrini *et al.* (2017) desarrollaron un modelo murino de mastitis por *S. aureus* Newbould 305 (ATCC 29740) utilizando ratones Balb/cJ, con el fin de evaluar el papel protector del extracto de *P. ginseng*, en la glándula mamaria murina. El número de bacterias recuperadas de las glándulas mamarias luego del pre-tratamiento con *P. ginseng* (50 mg/ml) y luego desafiadas con *S. aureus* (1×10^5) fue menor al recuento de bacterias en las glándulas mamarias inoculadas con el microorganismo sólo a las 48 y 96 h post-inoculación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo en donde también se observa una disminución de la carga bacteriana después del pre-tratamiento de las glándulas mamarias murinas con el AE a partir de las 96 h post-desafío con el microorganismo. Sin embargo, es de destacar que en el presente estudio se utiliza una dosis de AE mucho menor que la de *P. ginseng* con la que se logra disminuir significativamente la carga bacteriana hasta las 360 h (15 días) post-inoculación.

5.3.3.4. Recuperación de bacterias de hígado, riñones y sangre

A partir de las improntas en ATS de hígado y riñones de los ratones del grupo desafío se pudieron observar colonias presuntivas de *E. faecium* a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación. La coloración de Gram reveló cocos Gram positivos y la prueba de la catalasa resultó negativa, confirmando la identidad del microorganismo inoculado.

No se observaron colonias bacterianas en las improntas de hígado y riñones de los grupos inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) o grupo desafío, a las 360 h (15 días) post-inoculación.

De las muestras de sangre del grupo desafío no se recuperaron bacterias a ninguno de los tiempos ensayados. Este resultado podría explicarse debido al efecto inmunopotenciador/antibacteriano del AE en la glándula mamaria que favoreció la disminución significativa de la carga bacteriana.

5.3.3.5. Extracción de ARN total de glándula mamaria murina

Se realizó la extracción del ARN total de las glándulas mamarias R4 y L4 de los ratones de los grupos control vehículo, inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml), pre-tratados con AE y desafío (pre-tratamiento con AE y desafío con la cepa EF214), luego de las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación. En la **tabla 5** se detallan los valores obtenidos de DO a 260 y 280 nm de cada muestra, necesarios para estimar la pureza y calcular la concentración de ARN (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Tabla 5: Cuantificación del ARN extraído de las glándulas mamarias abdominales derechas (GMR4) e izquierdas (GML4) de ratones Balb/c hembras en período de lactancia.

Muestras	Glándula mamaria	Condición	DO 260nm	DO 280nm	$\frac{\text{DO}_{260\text{nm}}}{\text{DO}_{280\text{nm}}}$	Concentración de ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Grupo 1: Control (PBS/DMSO 0,05%)	GMR4	24 h	0,294	0,196	1,5	0,588
		48 h	0,413	0,242	1,7	0,826
		72 h	0,510	0,275	1,85	1,02
		96 h	0,8	0,450	1,7	1,6
	GML4	24 h	0,416	0,231	1,8	0,832
		48 h	0,497	0,239	2,08	0,994
		72 h	0,394	0,189	2,08	0,788
		96 h	0,170	0,082	2,07	0,34
Grupo 2 (inoculados con la cepa EF214 1×10^8 UFC/ml)	GMR4	24 h	0,165	0,073	2,26	0,33
		48 h	0,303	0,144	2,1	0,606
	GML4	72 h	0,210	0,101	2,08	0,42
		96 h	0,481	0,289	1,6	0,962
		24 h	0,155	0,072	2,15	0,31
		48 h	0,264	0,138	1,91	0,528

	GML4	72 h	0,244	0,158	1,5	0,488
		96 h	0,24	0,125	1,9	0,480
Grupo 3 (pre- tratamiento con aceite esencial)	GMR4	24 h	1,737	0,979	1,8	3,43
	GML4	24 h	0,196	0,121	1,6	0,392
Grupo 4 (desafío)	GMR4	24 h	0,179	0,095	1,8	0,358
		48 h	0,661	0,399	1,6	1,322
		72 h	0,174	0,094	1,9	0,348
		96 h	0,414	0,258	1,6	0,828
	GML4	24 h	0,154	0,093	1,7	0,308
		48 h	0,177	0,099	1,8	0,354
		72 h	1,043	0,667	1,6	2,086
		96 h	0,577	0,354	1,6	1,15

5.3.3.6. Cuantificación de la expresión de los genes *tlr2*, *tnf- α* , *il-1 β* e *il-10*

Se empleó la técnica de PCR en Tiempo Real, para evaluar los niveles relativos de expresión de los genes que codifican para TLR2, TNF α , IL-1 β e IL-10 en las diferentes muestras de ADNc retrotranscripto a partir del ARN total extraído de glándulas mamarias murinas con diferentes tratamientos a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación según se detalló en el punto anterior (5.3.3.5).

La eficiencia de amplificación definida como $[10^{(-1/\text{pendiente})} - 1]$ se determinó mediante curvas de amplificación con diluciones seriadas de ADNc para cada gen en estudio. Los valores de eficiencia obtenidos fueron de 1,1; 1,05; 1,05; 1,1 y 1,0 para *gapdh*, *tlr2*, *tnf α* , *il1 β* e *il-10* respectivamente.

En la **figura 42**, se observa la expresión relativa de TLR2 en la glándula mamaria de los ratones tratados. La expresión es relativa a la condición calibradora (control: glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05%) y el gen *gapdh* fue utilizado como gen de referencia o normalizador.

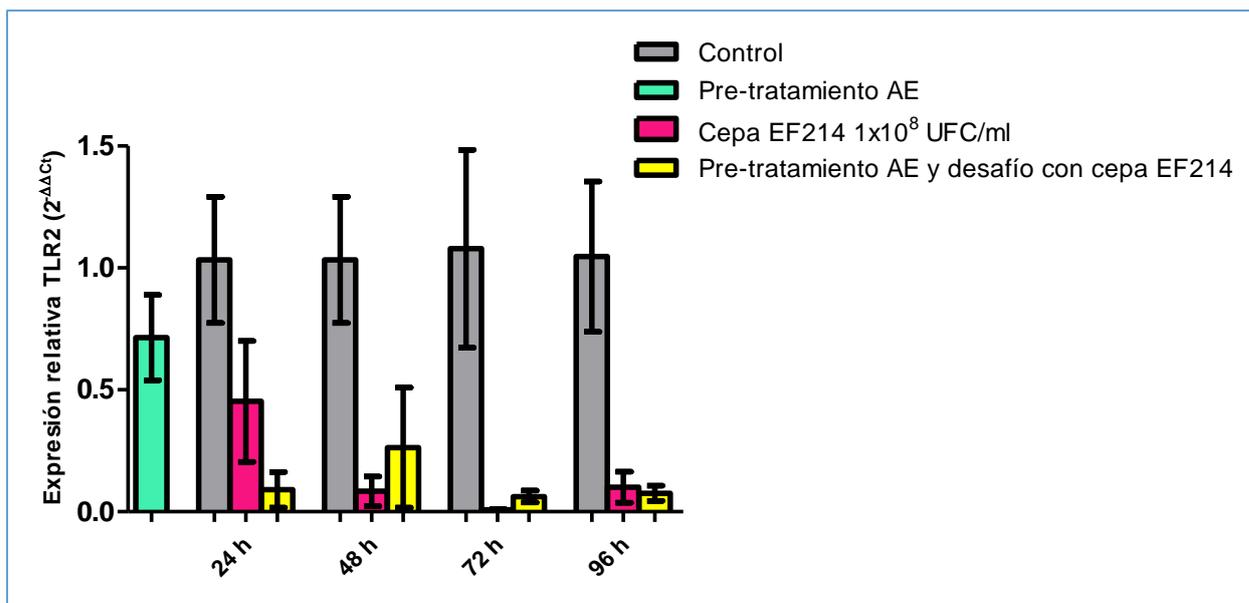


Figura 42: Expresión relativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) del receptor TLR2 en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras en periodo de lactancia. Condición calibradora (control: glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05%; gen normalizador: *gapdh*).

Como se observó en la **figura 42**, la expresión relativa de TLR2 en todos los grupos tratados se ve disminuida, a los tiempos ensayados (24, 48, 72 y 96 h), pero no se hallaron diferencias estadísticas significativas, comparado con el grupo control.

Los receptores tipo Toll, se expresan en muchos tipos celulares que forman parte de la respuesta inmune innata, reconocen los patrones moleculares de patógenos y median las respuestas inmunes innatas antimicrobianas en varios sistemas (Sabroe *et al.*, 2005). El TLR2 reconoce una amplia variedad de PAMPs pero está particularmente involucrado en el reconocimiento del ácido lipoteicoico de las bacterias Gram positivas (Kawai y Akira, 2010 y Mukherjee *et al.*, 2016). Luego del reconocimiento se desencadena una cascada de señales intracelulares que culminan en la activación del factor de transcripción NF- κ B, que se transloca al núcleo para activar la producción de citoquinas pro-inflamatorias y comenzar la respuesta inflamatoria necesaria para eliminar el microorganismo (Greef *et al.*, 2013). Sobre la base de lo descrito, sería esperable un incremento en la expresión de TLR2 en presencia de *E. faecium*, una bacteria Gram positiva. Sin embargo, en el presente trabajo no se observó esto.

Leendertse *et al.* (2008) desarrollaron un modelo murino de peritonitis luego de la inoculación intraperitoneal de una suspensión de *E. faecium* (8×10^7 UFC/ml) en ratones C57BL/6 de tipo salvaje y deficientes en los genes *tlr2* y *myd88*. Los ratones de tipo salvaje

lograron generar una respuesta inmune efectiva y eliminar los enterococos, sin embargo los ratones deficientes para TLR2 y MyD88 mostraron una respuesta temprana disminuida caracterizada por una leve infiltración de PMNs y un elevado recuento bacteriano en el sitio de la infección. Estos resultados demostraron que el receptor TLR2 está involucrado en el reconocimiento de *E. faecium*, lo que desencadena una respuesta inmune temprana óptima para hacer frente a la infección. Los hallazgos reportados por este grupo de investigación, no concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, el análisis histopatológico de las glándulas mamarias inoculadas con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) reveló una moderada a intensa infiltración de PMNs lo que demostró que el microorganismo fue reconocido por las células y desencadenó la cascada de transducción de señales que indujo una respuesta inflamatoria. Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que *E. faecium* es una bacteria que posee la capacidad de adherirse e internalizar en diferentes tipos celulares, incluidos los macrófagos (Baldassarri *et al.*, 2001; Koudihi *et al.*, 2011), podría sugerirse que el reconocimiento de este patógeno haya sido a través de otros PRR como los receptores tipo NOD (NLR) los cuales se sitúan en el citoplasma celular (Mitra *et al.*, 2016).

Günther *et al.* (2016) mediante un ensayo *in vitro* con células epiteliales mamarias bovinas (pbMEC) estimuladas con *S. uberis* (1×10^7 UFC/ml) demostraron que esta bacteria Gram positiva no fue reconocida por los TLR2 y no se logró la activación de NF- κ B. Estos autores sugieren que el ácido lipoteicoico y los demás componentes de la pared celular de *S. uberis* están dispuestos estructuralmente de tal manera que son irreconocibles por los TLR2 de las pbMEC. Según lo expuesto y teniendo en cuenta que *S. uberis* y *E. faecium* son microorganismos taxonómicamente relacionados se podría sugerir que la cepa EF214, no estaría siendo reconocida por los TLR2 de las células de las glándulas mamarias de ratón.

Mitra *et al.* (2016) demostraron en un modelo murino de mastitis que una cepa de *S. uberis* incrementó la expresión de TLR2 en la glándula mamaria 2 h post-infección y otra cepa del mismo microorganismo disminuyó la expresión de este gen en el mismo período de tiempo. Este hallazgo concuerda con lo observado en el presente trabajo, donde la expresión de TLR2 se vio disminuida en todos los grupos de ratones tratados aunque sin diferencias significativas con el control.

En el presente trabajo tampoco se observó una expresión incrementada de TLR2 en el grupo de animales que recibieron el pre-tratamiento con AE. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Baravalle *et al.* (2015) quienes demostraron que la expresión de TLR2 en glándulas mamarias de vacas Holstein tratadas con *P. ginseng* (3

mg/ml) fue mayor a la del grupo control. Sin embargo, el análisis histopatológico del grupo de animales pre-tratados con AE mostró una leve infiltración de PMNs (**figura 39**), demostrando que el AE fue reconocido por las células del sistema inmune innato desencadenando la cascada de transducción de señales que indujeron una respuesta inflamatoria local. Estos resultados sugieren que los componentes presentes en el AE, han sido reconocidos por otros PRR presentes en las células de la inmunidad innata.

Jiang *et al.* (2017) revelaron que la expresión de TLR2 en ratones infectados con *S. aureus* (1×10^9 UFC/ml) y luego tratados con polidatina (derivado del resveratrol, extraída de *Polygonum cuspidatum* Sieb usada popularmente en china), se mantuvo sin diferencias respecto al grupo control, pero disminuyó con respecto a la expresión observada en las glándulas inoculadas con *S. aureus*, demostrando que este compuesto fue capaz de disminuir la expresión de TLR2 en las glándulas infectadas con *S. aureus*. Estos resultados concuerdan en parte con los obtenidos en el presente trabajo, donde se observó una disminución no significativa de la expresión de TLR2 en las glándulas del grupo desafío respecto a la expresión observada en los grupos control y cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml).

Silvestrini *et al.* (2017) demostraron que el pre-tratamiento con un extracto de *P. ginseng* en un modelo murino de mastitis por *S. aureus* (1×10^5 UFC/ml) incrementó la expresión del gen TLR2 en glándula mamaria respecto al grupo de animales inoculados con el microorganismo solo a las 48 h post-inoculación. Estos resultados no concuerdan con los hallados en el presente estudio donde se detectó una disminución no significativa en los niveles de expresión de TLR2 tanto en el grupo de animales inoculados con la cepa EF214 como en aquellos del grupo desafío en todos los tiempos ensayados (24, 48, 72 y 96 h).

En la **figura 43**, se observa la expresión relativa de TNF- α en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras en periodo de lactancia.

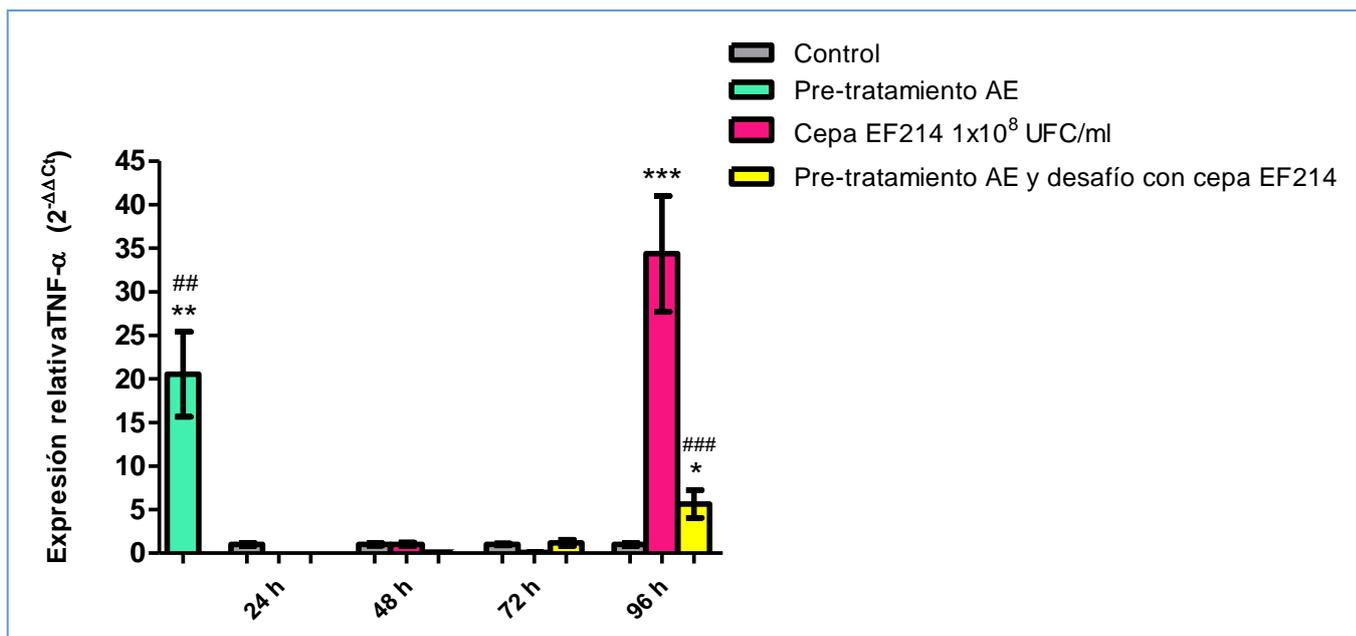


Figura 43: Expresión relativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia. Condición calibradora (control: glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05%; gen normalizador: gen *gapdh*).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativas respecto a la condición control: glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05%.

$p < 0,01$, ### $p < 0,001$ diferencias significativas respecto a glándulas mamarias inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml).

Los niveles de expresión de TNF- α en los ratones inoculados con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml) se mostraron incrementados respecto al grupo control a las 96 h post-inoculación ($p < 0,001$).

La expresión de esta citoquina también se observó incrementada en el grupo de animales que recibieron el pre-tratamiento con AE comparado con el grupo control ($p < 0,01$) y comparado con lo observado a las 24, 48 y 72 h en los ratones inoculados con la cepa EF214 ($p < 0,01$). Sin embargo, la expresión de esta citoquina en el grupo pre-tratado con AE fue significativamente menor respecto a lo observado a las 96 h para el grupo inoculado con la cepa EF214 ($p < 0,01$).

En los animales del grupo desafío se observó un incremento en la expresión de esta citoquina con respecto al grupo control solo a las 96 h post-inoculación ($p < 0,05$), siendo significativamente menor con respecto a la observada en los ratones tratados con la cepa EF214 ($p < 0,001$) (**figura 43**).

En la **figura 44**, se observa la expresión relativa de IL-1 β en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras en periodo de lactancia.

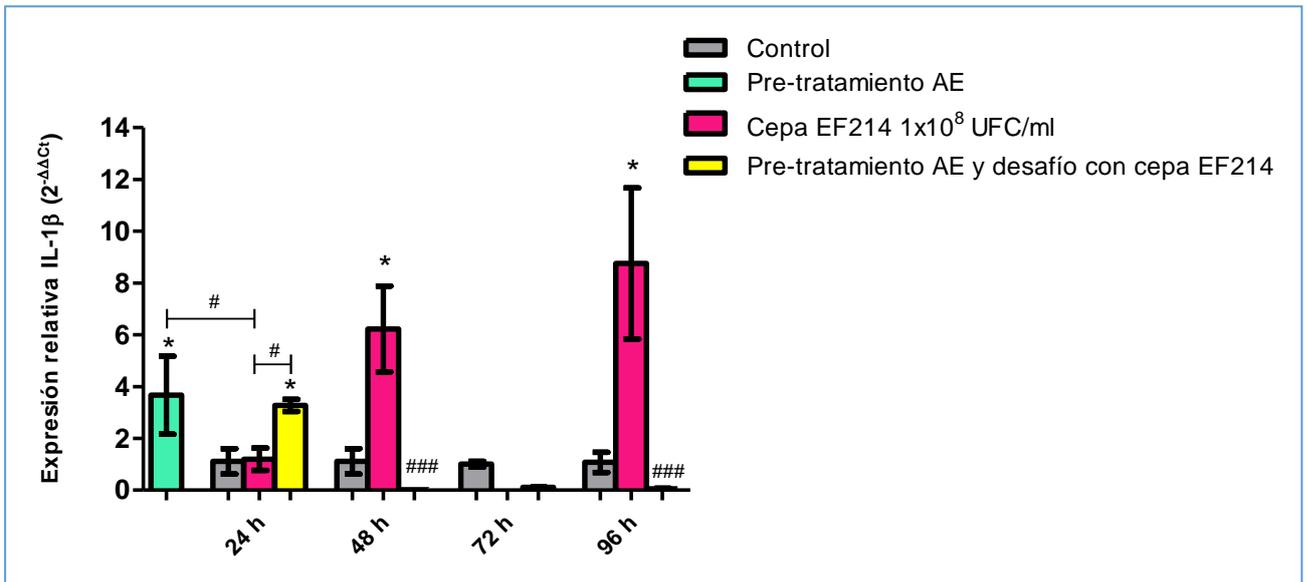


Figura 44: Expresión relativa (método 2^{-ΔΔCt}) de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia. Condición calibradora (control: glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05%; gen normalizador: gen *gapdh*).

*p<0,05, diferencia significativa respecto a la condición control: glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05%.

#p<0,05 y ###p<0,001 diferencias significativas respecto a glándulas mamarias inoculados con la cepa EF214 (1x10⁸ UFC/ml).

Los animales inoculados con la cepa EF214 (1x10⁸ UFC/ml) mostraron un incremento en los niveles de expresión de IL-1 β comparado con el control a las 48 y 96 h post-inoculación (p<0,05).

La expresión de IL-1 β también se vio incrementada en los animales que recibieron el pre-tratamiento con AE comparada con el grupo control (p<0,05) y comparado con lo observado a las 24 h en el grupo de animales inoculados con la cepa EF214 (p<0,05). Sin embargo, la expresión de IL-1 β fue menor en el grupo pre-tratado con AE comparado con la expresión encontrada a las 48 y 96 h en el grupo inoculado con el microorganismo

También se observó un incremento de esta citoquina en los animales del grupo desafío respecto al grupo control (p<0,05) y a los animales inoculados con la cepa EF214 (p<0,05) a las 24 h post-inoculación. Sin embargo, la expresión de IL-1 β disminuyó en el

grupo desafío comparado con el grupo inoculado con el microorganismo a las 48 y 96 h post-inoculación ($p < 0,001$) (**figura 44**).

Después del reconocimiento de un patógeno por parte de los PRR presentes en las células del sistema inmune innato, se desencadena una cascada de señales intracelulares cuyo objetivo final es activar la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6 las cuales desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria, promoviendo el reclutamiento de PMNs al sitio de infección para eliminar al microorganismo (Aitken *et al.*, 2011; Greef *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los obtenidos por Mitra *et al.* (2016) y Bannerman *et al.* (2004b) quienes observaron, tanto en un modelo murino como bovino de mastitis por *S. uberis*, que los niveles de expresión de TNF- α e IL-1 β estuvieron incrementados con respecto al control y fueron variables a lo largo de los tiempos ensayados.

La expresión incrementada de citoquinas pro-inflamatorias en el grupo de animales inoculados con la cepa EF214, demuestra que se desencadenó un proceso inflamatorio en las glándulas mamarias y esto fue lo que condujo al reclutamiento de los PMNs observados en el análisis histopatológico (**figuras 33 y 34**).

Baravalle *et al.* (2015) y Silvestrini *et al.* (2017) demostraron en un modelo bovino y murino, respectivamente, que la expresión relativa de IL-1 β y TNF- α , fue mayor en las glándulas mamarias que fueron pre-tratadas con extracto de *P. ginseng* respecto a las glándulas mamarias control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo donde la expresión relativa de ambas citoquinas pro-inflamatorias aumentó significativamente en las glándulas mamarias de los animales pre-tratados con AE (100 $\mu\text{g/ml}$).

La expresión incrementada de citoquinas pro-inflamatorias en las glándulas pre-tratadas con AE está relacionada con los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* en las que se evidenció la capacidad del AE para activar macrófagos (Montironi *et al.*, 2016a) e *in vivo* donde el análisis histopatológico reveló una leve infiltración de PMNs sin afectar la arquitectura del tejido mamario de los ratones pre-tratados con AE (**figuras 39 y 40**). Todos estos resultados indicarían que la dosis de AE (100 $\mu\text{g/ml}$) empleada para realizar el pre-tratamiento de las glándulas mamarias sería la óptima para desencadenar una respuesta

inflamatoria adecuada que prepararía a la glándula para una posterior infección con un microorganismo patógeno.

En un modelo murino de mastitis, Silvestrini *et al.* (2017) demostraron que la expresión de TNF- α , en los animales del grupo desafío (pre-tratados con *P. ginseng* y desafiados con *S. aureus*) se incrementó respecto a los animales inoculados con el microorganismo solo, a las 6 h post-inoculación. Sin embargo, Guo *et al.* (2017) observaron una disminución del nivel de expresión de TNF- α e IL-1 β en los animales que recibieron el pre-tratamiento con luteolina y el posterior desafío con *S. aureus* respecto a los animales inoculados con *S. aureus*, a las 24 h post-inoculación. Los resultados informados por estos autores concuerdan con los observados en el presente trabajo donde si bien los niveles de expresión de IL-1 β aumentaron en los animales del grupo desafío en comparación con ratones del grupo cepa EF214 a las 24 h, la expresión de ambas citoquinas pro-inflamatorias disminuyó en el grupo desafío respecto a lo observado en los ratones tratados con la cepa EF214 a las 48 y 96 h post-inoculación. Estos resultados se relacionan con el análisis histopatológico de las glándulas mamarias del mismo grupo de animales donde se observó una disminución de la inflamación a partir de las 24 h con respecto a lo observado en las glándulas inoculadas con la cepa EF214 (**figuras 39 y 40**), sugiriendo que el AE estaría ejerciendo un efecto que tiende a disminuir la respuesta inflamatoria causada por la cepa EF214. Este hallazgo es alentador debido a que un aumento exagerado y descontrolado en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias provocaría daños a nivel tisular (Guo *et al.*, 2017).

En la **figura 45**, se observa la expresión relativa de IL-10 en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras en periodo de lactancia a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación.

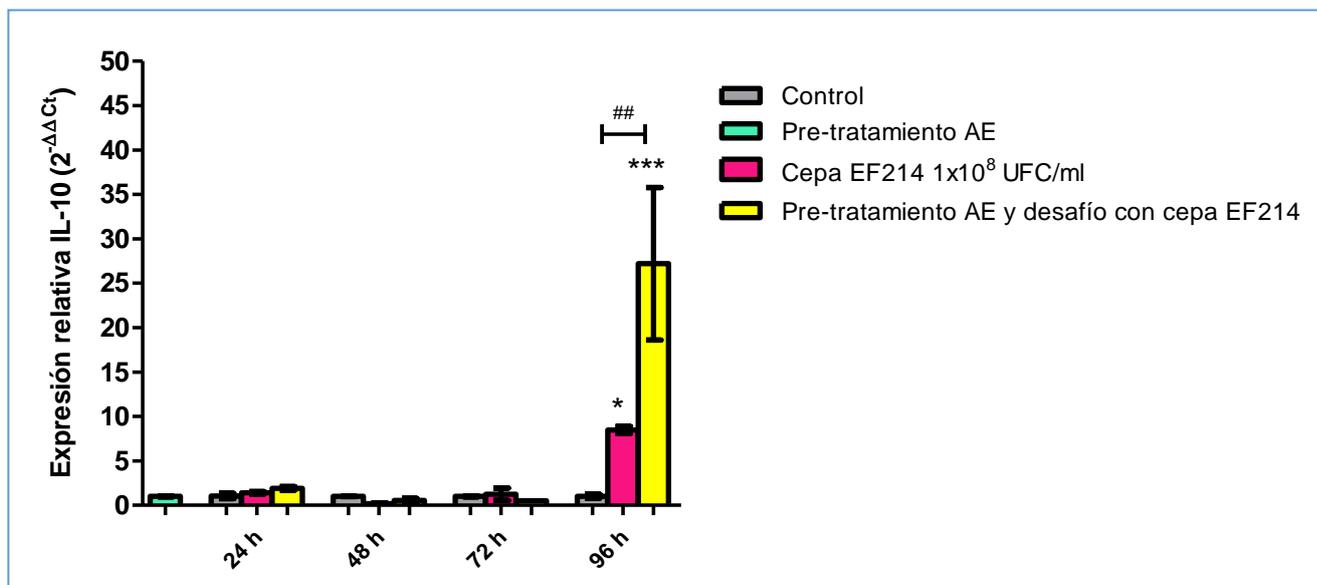


Figura 45: Expresión relativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia. Condición calibradora (control: glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05%; gen normalizador: gen *gapdh*).

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ diferencias significativas respecto a la condición control: glándulas mamarias inoculadas con PBS/DMSO 0,05%.

$p < 0,01$ diferencia significativa respecto a glándulas mamarias inoculados con la cepa EF214 1×10^8 UFC/ml.

Se detectaron bajos niveles de expresión de IL-10 en todos los grupos tratados, manteniéndose sin diferencia respecto al grupo control a las 24, 48 y 72 h post-inoculación. Sin embargo, en los animales inoculados con la cepa EF214, se observó un incremento significativo de IL-10 con respecto al control a las 96 h ($p < 0,05$). También se observó un incremento en los niveles de esta citoquina en los animales del grupo desafío comparado con el grupo control ($p < 0,001$) y comparado con el grupo inoculado con la cepa EF214 ($p < 0,01$) a las 96 h post-inoculación (**figura 45**).

La respuesta inmune innata se activa en las primeras horas luego de la penetración de un microorganismo patógeno al hospedador. En la glándula mamaria, se ha demostrado que la rapidez y magnitud de esta respuesta influyen en la resolución de la mastitis (Bannerman, 2009). Si bien la respuesta inflamatoria originada por los diferentes factores inmunes es necesaria porque conduce a la eliminación de los patógenos, es fundamental la regulación de estos procesos, porque podrían resultar perjudiciales y mortales si no son controlados (Di Gioia y Zanoni, 2015). IL-10, es una citoquina anti-inflamatoria, secretada

principalmente por macrófagos activados al final del proceso inflamatorio. Ejerce su acción suprimiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , e IL-12 por parte de los macrófagos, lo cual inhibe el reclutamiento de PMNs al sitio de la infección (Redpath *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2017).

En síntesis, los efectos biológicos de IL-10 se deben principalmente a su capacidad para reducir las respuestas originadas por los macrófagos y atenuar la actividad bactericida de PMNs para devolver el sistema a su estado de reposo cuando la infección se ha erradicado, contribuyendo a la disminución del daño tisular (Abbas *et al.*, 2012).

En el presente estudio se detectó que la cepa EF214 indujo la producción de IL-10 a las 96 h post-inoculación. Estos resultados concuerdan con los reportados por Bannerman *et al.* (2004b) y Trigo *et al.* (2009), quienes observaron niveles elevados de IL-10 a partir de las 42 h y 72 h post-infección en un modelo bovino y murino de mastitis por *S. uberis* y *S. agalactiae*, respectivamente.

Según Bannerman (2009), la inducción de IL-10 se ve inhibida o retrasada en vacas con mastitis que presentan recuentos bacterianos elevados o persistentes en leche. Entonces, los niveles de IL-10 alcanzados durante la infección por la cepa EF214 estarían relacionados con el número casi constante de bacterias observado en el tejido mamario desde las 96 hasta las 360 h (15 días) post-infección (**figura 41**). Además, estos niveles no serían suficientes para contrarrestar los efectos de las citoquinas pro-inflamatorias y comenzar a resolver la inflamación en el tejido mamario.

Guo *et al.* (2017), reportaron que el pre-tratamiento con luteolina en un modelo murino de mastitis por *S. aureus* provocó un incremento en los niveles de IL-10. Esta citoquina, ejerce sus efectos anti-inflamatorios a través de la regulación positiva del antagonista del receptor de IL-1 β y de los receptores solubles de TNF- α , lo que altera la capacidad de estas citoquinas para ejercer sus efectos (Bannerman, 2009). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo donde el aumento en la expresión de IL-10 coincide con la disminución de TNF- α , IL-1 β en los animales del grupo desafío, respecto al grupo inoculado con la cepa EF214. Por otro lado, el incremento de IL-10 se relaciona con la disminución de la inflamación observada a partir de las 24 h post-desafío (**figuras 39 y 40**) y con la disminución significativa en el número de bacterias a partir de las 96 h post-infección comparado con el recuento bacteriano observado en el grupo inoculado con la cepa EF214 (**figura 41**).

Estos resultados sugieren que el AE potenciaría la expresión de IL-10, lo que resulta benéfico para favorecer la resolución del proceso inflamatorio disminuyendo los signos de la mastitis, teniendo en cuenta que un aumento exagerado y descontrolado en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias provocaría daños a nivel del tejido mamario (Bannerman, 2009; Guo *et al.*, 2017).

5.3.3.7. Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺/CD69⁺ y CD8⁺/CD69⁺)

A partir de muestras de sangre de los ratones de todos los grupos obtenidas a las 96 h post-inoculación, se analizó el porcentaje de LT CD4⁺ y CD8⁺ que expresan el marcador CD69⁺ mediante citometría de flujo. CD69⁺ es un marcador de activación linfocitaria el cual se expresa en los LT dentro de los 30 minutos de ocurrida la presentación antigénica (Maino *et al.*, 1995).

En la **figura 46**, se observa el porcentaje de células T CD4⁺/CD69⁺ y CD8⁺/CD69⁺ de los ratones del grupo control, inoculados con la cepa EF214 (1x10⁸ UFC/ml), pre-tratados con AE (100 µg/ml) y grupo desafío.

A	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Control	<p>CD4 FITC-A vs CD69 APC-A. Quadrant percentages: Q1-1: 19,30 ± 0,28; Q2-1: 1,35 ± 0,07; Q3-1; Q4-1.</p>	<p>CD8 PE-A vs CD69 APC-A. Quadrant percentages: Q2: 0,30 ± 0,0; Q3: 10,50 ± 0,14; Q4.</p>
Pre-tratamiento AE	<p>CD4 FITC-A vs CD69 APC-A. Quadrant percentages: Q1-1: 24,75 ± 1,48; Q2-1: 1,5 ± 0,28; Q3-1; Q4-1.</p>	<p>CD8 PE-A vs CD69 APC-A. Quadrant percentages: Q2: 0,15 ± 0,07; Q3: 8,55 ± 0,35; Q4.</p>
Cepa EF214 1x10 ⁸ UFC/ml	<p>CD4 FITC-A vs CD69 APC-A. Quadrant percentages: Q1-1: 23,90 ± 0,14; Q2-1: 2,00 ± 0,1; Q3-1; Q4-1.</p>	<p>CD8 PE-A vs CD69 APC-A. Quadrant percentages: Q2: 0,50 ± 0,14; Q3: 11,35 ± 0,77; Q4.</p>
Desafío	<p>CD4 FITC-A vs CD69 APC-A. Quadrant percentages: Q1-1: 16,20 ± 1,69; Q2-1: 1,05 ± 0,21; Q3-1; Q4-1.</p>	<p>CD8 PE-A vs CD69 APC-A. Quadrant percentages: Q2: 0,25 ± 0,07; Q3: 9,85 ± 0,21; Q4.</p>

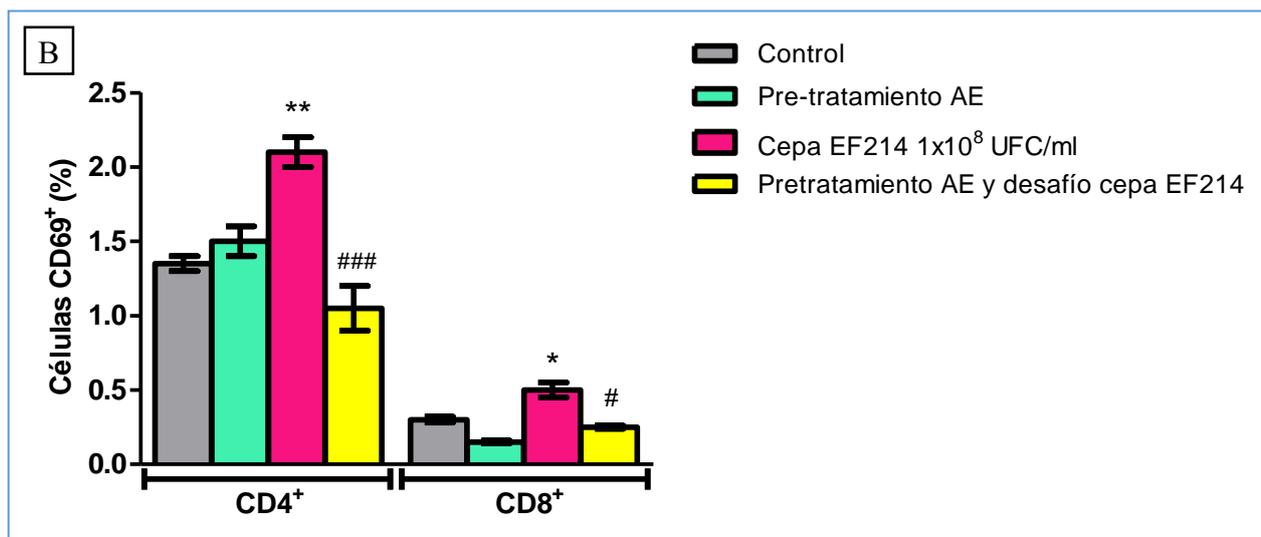


Figura 46: A) gráficos dot plot (de puntos) y B) porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan el marcador CD69⁺ en sangre de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, 96 h post-inoculación intramamaria con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), cepa EF214 (1x10⁸ UFC/ml), pre-tratadas con AE (100 µg/ml) y grupo desafío (pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214).

*p<0,05; **p<0,01 diferencias significativas respecto al grupo control.

#p<0,05, ###p<0,001 diferencias significativas respecto a glándulas mamarias inoculados con la cepa EF214 1x10⁸ UFC/ml.

En la **figura 46**, se observa un incremento en el número de LT CD4⁺ y CD8⁺ activados, sólo en el grupo inoculado con la cepa EF214 comparado con el grupo control (p<0,01; p<0,05, respectivamente). En los animales del grupo desafío el porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas fue significativamente menor respecto a lo observado en el grupo inoculado con la cepa EF214 (p<0,001; p<0,05, respectivamente).

E. faecium es una bacteria Gram positiva que presenta la capacidad de formar biofilm (Cerioli *et al.*, 2018). Los microorganismos del género *Enterococcus* son considerados patógenos extracelulares. Sin embargo, se ha demostrado que poseen la habilidad de adherirse e internalizar en diferentes tipos celulares, incluidos los macrófagos, y sobrevivir dentro de ellos evadiendo la respuesta inmune (Baldassarri *et al.*, 2001; Kouidhi *et al.*, 2011).

La inmunidad antimicrobiana comienza con una respuesta innata temprana, sin embargo, si un patógeno es capaz de evadir o no es completamente eliminado, la inmunidad adaptativa se activa (Tizard, 2009).

Las células efectoras que intervienen en la inmunidad adaptativa son los LT y LB. Las células dendríticas regulan ambas formas de respuesta inmune debido a que captan el

antígeno activando las defensas innatas y simultáneamente, procesan estos antígenos y actúan como CPA para dar inicio a la respuesta inmune adaptativa. Las CPA reconocen al microorganismo invasor, dando inicio al procesamiento del antígeno que incluye la fragmentación de las moléculas del mismo en pequeños péptidos y la unión de éstos a las moléculas del CMH. Hay dos clases de moléculas del CMH, las CMH de clase I, que presentan principalmente antígenos de microorganismos intracelulares a los LT CD8⁺ y las CMH de clase II, que presentan principalmente antígenos exógenos, es decir de microorganismos extracelulares a los LT CD4⁺ (Tizard, 2009).

Teniendo en cuenta que *E. faecium* es un microorganismo extracelular, el aumento en el número de LT CD4⁺ activados, observado en el grupo inoculado con EF214 a las 96 h, es esperable debido a que el patógeno fue reconocido por una CPA y presentado a las células T CD4⁺ a través del CMH II. Sin embargo, también se observó un incremento en el número de LT CD8⁺ activados, lo que podría explicarse debido a que este patógeno tiene la capacidad de internalizar en diferentes tipos de células, por lo que pudo haber sido presentado a los LT CD8⁺ a través del CMH I. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Trigo *et al.* (2009) en un modelo murino de mastitis por *S. agalactiae*, donde observaron que este microorganismo provocó un aumento de los LT CD4⁺ y CD8⁺ activados en los ganglios linfáticos mamarios a las 24 h post-inoculación. A pesar de haber estudiado diferentes microorganismos es importante aclarar que al igual que *E. faecium*, *S. agalactiae* es una bacteria extracelular, que presenta además la capacidad de adherirse e invadir diferentes tipos celulares durante el curso de la infección (Tenenbaum *et al.*, 2007).

Cuando las CPA presentan el antígeno a través de moléculas del CMH I a los LT CD8⁺, estos se diferencian a LT CD8⁺ citotóxicos (LT_C) efectores. La diferenciación de LT CD8⁺ a LT_C efector implica la adquisición de mecanismos para llevar a cabo la destrucción de las células, como el desarrollo de gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas como perforinas y granzimas y la expresión de moléculas como el FasL que se unirá a Fas sobre la célula diana, y de esta manera destruirán por apoptosis a la célula infectada. Por otro lado, los LT_C tienen la capacidad de secretar citoquinas como IFN- γ y TNF- α , que activan a los macrófagos para que fagociten más eficientemente a los microorganismos intracelulares (Abbas *et al.*, 2012).

En síntesis, las subpoblaciones de LT CD4⁺ y CD8⁺ se activaron a las 96 h en el grupo de ratones inoculados con la cepa EF214 indicando que fue necesaria la activación de la respuesta inmune adaptativa para resolver la infección causada por este patógeno. Si bien

las subpoblaciones de células T fueron cuantificadas en sangre se ha descrito que hay un reclutamiento selectivo de las subpoblaciones de LT a la glándula mamaria bovina durante la mastitis, que depende del tipo de patógeno. En muestras de leche obtenidas de vacas con mastitis estafilocócica, se observó un aumento en el número de LT CD4⁺, mientras que en la leche de vacas con mastitis estreptocócica se observaron aumentos tanto de LT CD4⁺ como CD8⁺ (Soltys y Quinn, 1999). Considerando esto y que *E. faecium* es un microorganismo taxonómicamente relacionado con el género *Streptococcus*, los resultados obtenidos serían los esperables. Estos resultados además, se relacionan con la presencia de macrófagos y linfocitos observada en el análisis histopatológico de este grupo de ratones (**figuras 33 y 34**).

En los animales que recibieron el pre-tratamiento con AE y en los animales del grupo desafío no se observó incremento en el número de LT CD4⁺ y CD8⁺ activados. Este resultado indica que no fue necesaria la activación de la inmunidad adaptativa y sugiere que los mecanismos de la inmunidad innata desencadenados en presencia del AE habrían sido suficientes para controlar la infección. Estos resultados se relacionan con los bajos niveles de TNF- α e IL-1 β , la disminución de PMNs y la disminución en el recuento bacteriano, observados en el grupo desafío.

Los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que el AE de *M. verticillata* moduló la respuesta inmune innata de la glándula mamaria pre-tratada con AE desencadenando una respuesta inflamatoria con incremento en la expresión de TNF- α e IL-1 β , lo que indujo el reclutamiento de PMNs hacia la glándula mamaria preparándola de esta forma para una posterior infección por un microorganismo patógeno. De acuerdo a lo observado en el grupo desafío, donde las glándulas recibieron el pre-tratamiento con AE y el posterior desafío con la cepa EF214 (1x10⁸ UFC/ml) la infección se pudo controlar en las primeras horas con la disminución gradual del patógeno, sin la intervención de la inmunidad adaptativa.

5.3.3.8. Evaluación de anticuerpos totales (IgM, IgG e IgA) específicos para la cepa *E. faecium* EF214 en glándulas mamarias y suero

Se empleó la técnica de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos totales anti-EF214 en homogenato de glándula mamaria y en suero de los grupos de ratones evaluados. Las muestras de sangre se tomaron a las 360 h (15 días) post-inoculación.

En la **figura 47 A**, se observan los títulos de anticuerpos en suero y en la **figura 47 B**, los títulos de anticuerpos en homogenato de glándula mamaria.

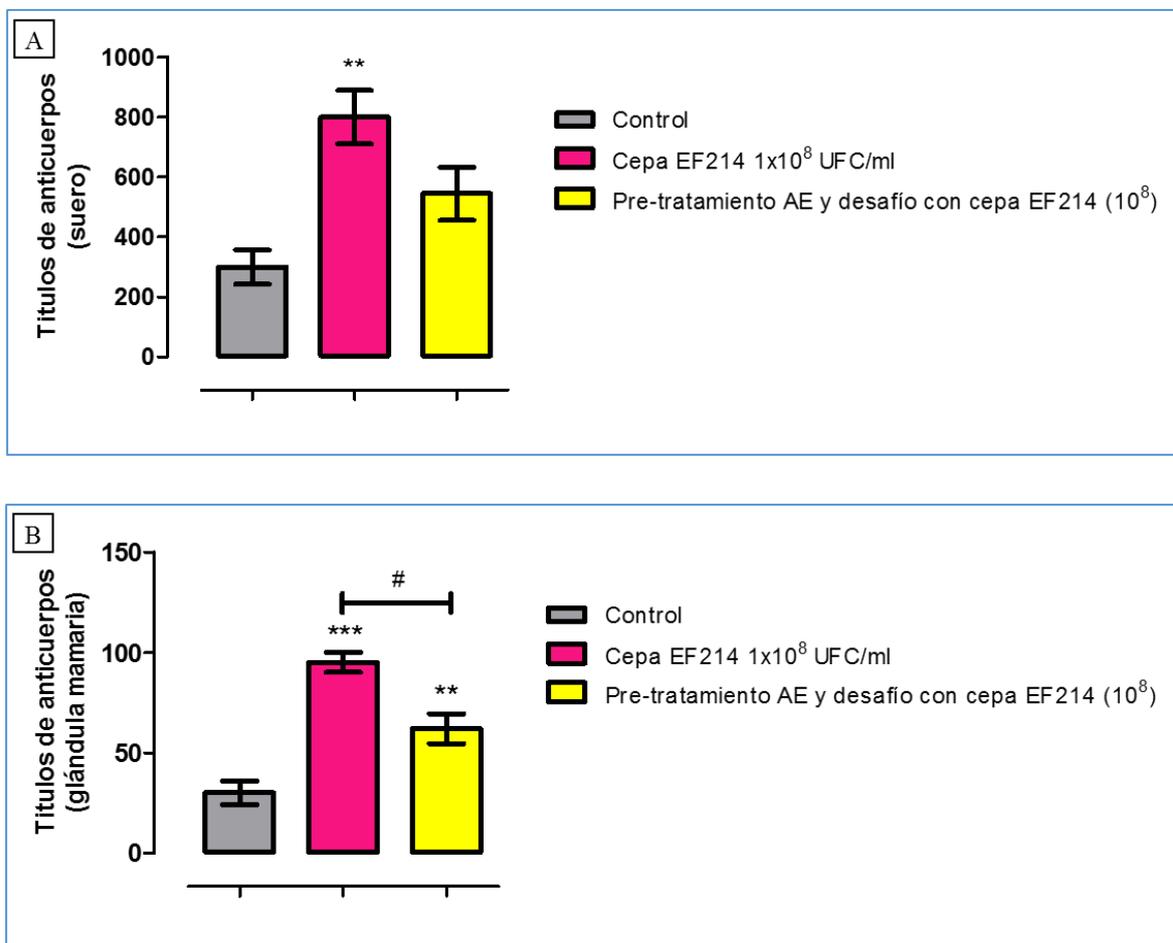


Figura 47: Anticuerpos totales (IgM, IgG e IgA) anti- EF214 en **A**) suero y en **B**) glándula mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, 360 h (15 días) post-inoculación con PBS/DMSO 0,05% (grupo control vehículo), la cepa EF214 (1x10⁸ UFC/ml) y grupo desafío (pre-tratadas con aceite esencial y luego desafiadas con la cepa EF214).

p<0,01; *p<0,001; diferencias significativas respecto al grupo control vehículo. #p<0,05 diferencia significativa respecto al grupo inoculado con la cepa EF214 1x10⁸ UFC/ml.

Se observó un incremento significativo en los niveles de anticuerpos anti-EF214 en suero y homogenatos de glándula mamaria del grupo inoculado con la cepa EF214 (1x10⁸ UFC/ml) comparado con el grupo control (p<0,01 y p<0,001, respectivamente).

En el suero y homogenatos de glándula mamaria del grupo desafío se observó un incremento en la producción de anticuerpos anti-EF214 con respecto al grupo control, que sólo fue significativo en la glándula mamaria (p<0,01) (**figura 47 A y B**).

Los niveles de anticuerpos tanto en las glándulas mamarias como en el suero de los animales del grupo desafío fueron menores comparados con el grupo inoculado con la cepa EF214, aunque solo fue significativo en las glándulas mamarias ($p < 0,05$) (**figura 47 B**).

La producción de anticuerpos está determinada por la activación de los LB. Los LTfh activados por el reconocimiento de un antígeno presentado por las células dendríticas en moléculas del CMH II, cooperan con los LB para que éstos se diferencien en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Fainboim y Geffner, 2017). Los anticuerpos, que pueden ser de clase IgM, IgG, IgA o IgE, opsonizan a los microorganismos activando, entre otras cosas, la fagocitosis celular. Del mismo modo neutralizan la acción de las toxinas producidas por ciertos patógenos (Tizard, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, se observó un incremento en los niveles de anticuerpos anti-EF214, tanto en el suero como en las glándulas mamarias del grupo inoculado con la cepa EF214. Estos resultados concuerdan con los informados por Trigo *et al.* (2009) quienes observaron un aumento en los niveles de anticuerpos anti-*S. agalactiae* en las glándulas mamarias y en el suero de ratones infectados a las 240 y 360 h (10 y 15 días, respectivamente) post-inoculación intramamaria en ratones Balb/c.

El incremento en los niveles de anticuerpos anti-EF214, se relaciona con la disminución en el recuento bacteriano observada a las 360 h en el tejido mamario inoculado con la cepa EF214 (1×10^8 UFC/ml). Sin embargo, como lo muestra la **figura 41**, la bacteria no fue completamente erradicada de la glándula mamaria, lo que podría indicar que si bien la inmunidad humoral, cumpliría un rol importante en el control de la mastitis causada por *E. faecium*, no sería suficiente para eliminar al patógeno del tejido mamario. Este resultado evidencia la capacidad de esta bacteria para internalizar en las células de la glándula mamaria y evadir el sistema inmune.

Los niveles de anticuerpos detectados en el grupo desafío demostraron que en presencia del AE no fue necesaria la activación de la inmunidad humoral.

Todos los resultados obtenidos en esta tesis doctoral demuestran el efecto modulador del AE sobre los mecanismos de la respuesta inmune innata en un modelo murino de mastitis y su capacidad para controlar la infección en las primeras horas sin que sea necesaria la activación de la respuesta inmune adaptativa.

6. CONCLUSIONES

✓ El análisis químico del aceite esencial (AE) obtenido de *M. verticillata*, proveniente de la provincia de San Luis, reveló un quimiotipo de tipo 3 (pulegona-mentona) similar al aceite de esta misma especie anteriormente caracterizado como inmunoestimulante.

✓ AE no resultó tóxico para células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T), a las concentraciones y tiempos ensayados.

✓ AE estimuló los mecanismos de adherencia y fagocitosis de macrófagos murinos (RAW 264.7) y activó uno de los mecanismos microbicidas a través de la producción de ROS. Además, demostró un efecto antiinflamatorio disminuyendo los niveles de NO en presencia de LPS e IFN- γ .

✓ AE no afectó el peso, la coloración o la arquitectura de las glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras en período de lactancia, independientemente de la concentración ensayada o el tiempo de exposición.

✓ AE (100 $\mu\text{g/ml}$) resultó la dosis óptima como inmunoestimulante en glándula mamaria activando el reclutamiento de PMNs sin afectar la arquitectura del tejido glandular.

✓ La cepa *E. faecium* EF214 (1×10^8 UFC/ml), que logró establecer una infección intramamaria en ratones Balb/c hembras, afectó la coloración, peso y arquitectura de la glándula mamaria. No fue reconocida por TLR2, sin embargo, produjo un incremento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y el reclutamiento de un gran número de PMNs. La bacteria fue capaz de diseminar a diferentes órganos y permaneció en la glándula con un recuento estable desde las 96 a las 360 h activando la inmunidad adaptativa celular y humoral. Alrededor de las 96 h se produjo un incremento de la citoquina anti-inflamatoria IL-10.

✓ El pre-tratamiento con AE (100 $\mu\text{g/ml}$) reveló que AE no fue reconocida por TLR2, sin embargo provocó un aumento en la expresión de IL-1 β y TNF- α lo que indujo una leve infiltración de PMNs asociada con un cambio en la coloración de las glándulas sin afectar la arquitectura, tamaño y peso de las mismas. No incrementó la expresión de IL-10 ni activó la inmunidad adaptativa celular.

✓ En los animales del grupo desafío se observó una mejoría macroscópica de las glándulas mamarias asociada a una menor infiltración de PMNs y un recuento bacteriano

más bajo a partir de las 96 h post-inoculación respecto al recuento en las glándulas mamarias infectadas con la cepa EF214. La expresión de TLR2 se vio disminuida aunque sin diferencias con respecto al grupo control. A las 48 y 96 h se observó una disminución en la expresión de TNF- α e IL-1 β que coincide con un incremento en la expresión de IL-10. No se activó la inmunidad adaptativa celular ni humoral.

Sobre la base de lo expresado se confirma el potencial inmunomodulador del AE de *M. verticillata*. Los resultados obtenidos sientan base para futuros estudios en un modelo bovino que permita la posible aplicación del AE de *M. verticillata* como terapia alternativa/complementaria en la prevención de la mastitis bovina.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pillai, S. (2012). *Inmunología Celular y Molecular*. (7ma. ed). España: Elsevier. ISBN:9788480869164.
- Abdillahi, H.S., Verschaeve, L., Finnie, J.F. y Van Staden. J. (2012). Mutagenicity, antimutagenicity and cytotoxicity evaluation of South African *Podocarpus species*. *Journal of Ethnopharmacology*: 139 (3): 728-738. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.044>.
- Aderem, A. y Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review Of Immunology*; 17 (1): 593-623. DOI <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>.
- Aitken, S. L., Corl, C. M. y Sordillo. L.M. (2011). Pro-inflammatory and pro-apoptotic responses of TNF- α stimulated bovine mammary endothelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 40 (3-4): 282-290. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.01.016>.
- Akira, S., Uematsu, S. y Takeuchi. O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*: 124 (4): 783-801. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
- Albornoz, H., Bangulo, H., Camou, T., Guerra, S. y Scarppita, C. (2005). Guías de prevención y control de enterococo resistente a vancomicina. Ministerio de salud publica. http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/publicaciones/FNR_guia_enterococo.pdf.
- Alder, J., Li, T., Yu, D., Morton, L., Silverman, J., Zhang, X.X., Critchley, I. y Thorne. G. (2003). Analysis of daptomycin efficacy and breakpoint standards in a murine model of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* renal infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: 47 (11): 3561-3566. DOI <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3561-3566.2003>.
- Aleksieva, V. y Todorov. D. (1981). Cases of clinical and subclinical mastitis due to "D" streptococci. *Veterinarno-Meditsinski Nauki*: 18 (10): 86-91.
- Ali, I. B.E.H., Guetat, A. y Boussaid. M. (2013). A combined approach using allozymes and volatiles for the characterization of Tunisian *Thymbra capitata* (L.) Cav. (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*: 43: 477-483. DOI <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.059>.
- Anderson, S.M., Rudolph, M.C., McManaman, J.L. y Neville. M.C. (2007). Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis!. *Breast Cancer Research*: 9 (1): 204. DOI <https://doi.org/10.1186/bcr1653>.
- Atabai, K., Sheppard, D. y Werb. Z. (2007). Roles of the innate immune system in mammary gland remodeling during involution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*: 12 (1): 37-45. DOI <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9036-6>.
- Avila Téllez, S. y Romero. L. (2010). Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. Sitio Argentino de Producción Animal. Recuperado el 5 de febrero de 2019. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/110-anatomia.pdf.
- Baldassarri, L., Cecchini, R., Bertuccini, L., Ammendolia, M.G., Iosi, F., Arciola, C.R., Montanaro, L., Di Rosa, R., Gherardi, G., Dicuonzo, G. y Orefici. G. (2001). *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Medical Microbiology and Immunology*: 190 (3): 113-120. DOI <http://sci-hub.tw/10.1007/s00430-001-0096-8>.
- Bamba, D., Bessière, J.M., Marion, C., Pélissier, Y. Fourasté. I. (1993). Essential oil of *Eupatorium odoratum*. *Planta Medica*: 59 (02): 184-185.
- Bandoch, P. y Melo, L.D.S.D. (2011). Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. *Publicações Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG Biológicas, Sciences*: 17 (1): 47-51.
- Bannerman, D.D., Paape, M.J., Lee, J.W., Zhao, X., Hope, J.C. y Rainard. P. (2004a). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*: 11 (3): 463-472. DOI <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.3.463-472.2004>.
- Bannerman, D D., Paape, M.J., Goff, J.P., Kimura, K., Lippolis, J.D. y Hope. J.C. (2004b). Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Veterinary Research*: 35 (6): 681-700. DOI <https://doi.org/10.1051/vetres:2004040>.

- Bannerman, D.D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science*: 87 (13): 10-25. DOI <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1187>.
- Bak, M. J., Hong, S. G., Lee, J. W. y Jeong, W. S. (2012). Red ginseng marc oil inhibits iNOS and COX-2 via NF κ B and p38 pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Molecules*: 17 (12): 13769-13786. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules171213769>.
- Baratta, M.T., Dorman, H.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. y Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*: 13 (4): 235-244. DOI [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(1998070\)13:4<235::AID-FFJ733>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(1998070)13:4<235::AID-FFJ733>3.0.CO;2-T).
- Baravalle, C., Dallard, B.E., Cadoche, M.C., Pereyra, E.A.L., Neder, V.E., Ortega, H.H. y Calvino, L.F. (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 (1-2): 52-60. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.07.003>.
- Baravalle, C., Silvestrini, P., Cadoche, M.C., Beccaria, C., Andreotti, C.S., Renna, M.S., Pereyra, E.A.L., Ortega, H.H., Calvino, L.F. y Dallard, B.E. (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: 52-60. DOI <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.025>.
- Benavides F.J., y Guénet, J.L. (2003). Biología y manejo reproductivo del ratón. En: *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos y Aplicaciones*. (pp. 59-83). Disponible en: <http://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/00-GENETICA-indice.pdf.pdf>.
- Boscá, L., Zeini, M., Través, P. G. y Hortelano, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*: 208 (2): 249-258. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.11.035>.
- Bradley, A.J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*: 164 (2):116-128. DOI <https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>.
- Brouillette, E., Grondin, G., Lefebvre, C., Talbot, B.G. y Malouin, F. (2004). Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*: 101 (4): 253-262. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.008>.
- Brouillette, E. y Malouin, F. (2005). The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes and Infection*: 7 (3): 560-568. DOI <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.11.008>.
- Burt, S. (2004). Essential oils: antibacterial properties and potential applications in food: a review. *International Journal of Food Microbiology*: 94 (3): 223-253. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- Bustos Saggio, D.H. (2018). Historia natural de la mastitis bovina. Tesis para optar al grado de Veterinario, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina.
- Calvino, L.F. 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 últimos 25 años. *Revista FAVE Sección Ciencias Veterinarias*: 4 (1): 29-40.
- Calvino, L.F. (2007). Control de mastitis causadas por estreptococos ambientales. Jornada APROCAL. INTA Rafaela. Disponible en: <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/CALVINHO-Jornada-APROCAL-INTA-JULIO-07.pdf>.
- Calvino, L.F. (2010). Terapia antibiótica para vaca seca: revisión 2010. Jornada APROCAL (Asociación Pro Calidad de la Lechey sus Derivados). E.E.A. INTA.Rafaela. Disponible en: <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/Terapia-Vaca-Seca-Revisión-Calvino-2010.pdf>.
- Camussone, C.M., Veaute, C.M., Porporatto, C., Morein, B., Marcipar, I.S. y Calvino, L.F. (2013). Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated

with ISCOMATRIX™ adjuvant *Journal of Dairy Research*: 80 (1): 72-80. DOI <https://doi.org/10.1017/S0022029912000593>.

- Cariddi, L.N., Sabini, L.I. y Maldonado. A.M. (2005). Propiedades inmunológicas y mitogénicas de productos derivados de *Minthostachys verticillata* sobre linfocitos de niños alérgicos con infección viral. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*: 36 (2): 35-40.
- Cariddi, L.N., González-Pereyra, M.L., Gambero, M.L., Demo, M., Isola M.C., Franzoni L., Sabini L.I. y Maldonado. A.M., (2006). *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling: a South American plant with anti-inflammatory effect *in vitro*. *Allergy and Clinical Immunology International - Journal of the World Allergy Organization*: 18: 234-241. DOI 10.1027/0838-1925.18.6.234.
- Cariddi, L.N., Panero, A., Demo, M.S., Sabini, L.I., Maldonado, A.M., Grosso, M. y Zygadlo. J. (2007). Inhibition of immediate-type allergic reaction by *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling essential oil. *Journal of Essential Oil Research*: 19 (2): 190-196. DOI <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699257>.
- Cariddi, L., Moser, M., Andrada, M., Demo, M., Zygadlo, J., Sabini, L. y Maldonado. A. (2009a). The effect of *Minthostachys verticillata* essential oil on the immune response of patients allergic to dust mites. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*: 8 (3): 224-233.
- Cariddi, L.N., Alaniz, F.S., Moser, M., Andrada, M.C., Zygadlo, J., Sabini, L. y Maldonado. A.M. (2009b). Antioxidants effects of essential oil from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. *Biocell*: 33(2):167.
- Cariddi, L.N., Escobar, F. M., Sabini, M.C., Torres, V.C., Zygadlo, J.A. y Sabini. L. I. (2010). First approaches in the study of cytotoxic and mutagenic damage induced by cold aqueous extract of *Baccharis articulata* on normal cells. *Molecular Medicinal Chemistry*: 21: 4-7.
- Cariddi, L.N., Escobar, F.M., Sabini, C., Torres, C., Reinoso, E., Zamora, F., Sutil, S., Zanon, S. y Sabini. L. (2011a). Determinación de muerte celular inducida por extracto acuoso caliente de *Baccharis articulata* en células mononucleares humanas. XX Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina “Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos” Fortaleza, Brasil. pp367.
- Cariddi, L., Escobar, F., Moser, M., Panero, A., Alaniz, F., Zygadlo, J., Sabini, L. y Maldonado. A. (2011b). Monoterpenes isolated from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling essential oil modulates immediate-type hypersensitivity responses *in vitro* and *in vivo*. *Planta Medica*: 77 (15): 1687-1694. DOI <https://doi.org/10.1055/s-0030-1271090>.
- Cariddi, L., Escobar, F., Sabini, C., Torres, C., Reinoso, E., Cristofolini, A., Comini, L., Núñez Montoya, S. y Sabini. L. (2012). Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. *Food and Chemical Toxicology*: 50 (2): 155-161. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.002>.
- Cariddi, L.N., (2013a). The role of essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb) Epling, (Lamiaceae) and its active metabolites in immediate-type hypersensitivity responses. En: Govil, J.N., y Bhattacharya, S. (Eds.), *Recent Progress in Medicinal Plants Essential Oils II*. (pp 487-495). Houston, Estados Unidos: Studium Press, LLC.
- Cariddi, L.N., Montironi, I.D. y Reinoso. E.B. (2013b). Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* y uno de sus compuestos mayoritarios sobre cepas aisladas de mastitis bovina. *Dominguezia*: 29: 96.
- Cariddi, L.N., Sabini, M.C., Escobar, F.M., Bacchetti, R., Montironi, I., Merckis, C., Reinoso, E.B., Núñez Montoya, S., Zanon, S.M., Comini, L.R. y Sabini. L.I. (2015). *In Vitro* and *In Vivo* Cytogenotoxic Effects of Hot Aqueous Extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *BioMed Research International*: 2015. Article ID 270973. DOI <http://dx.doi.org/10.1155/2015/270973>.
- Cariddi, L. N., Escobar, F. M., Sabini, M. C., Campra, N. A., Bagnis, G., Decote-Ricardo, D., Freire-de-Lima, C.G., Mañas, F., Sabini, L.I. y Dalcero, A.M. (2016). Phenolic acid protects of renal damage induced by ochratoxin A in a 28-days-oral treatment in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*: 43: 105-111. DOI <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.03.004>.
- Carrillo-Casas, E.R., y Miranda-Morales, R.E. (2012). Bovine Mastitis Pathogens: Prevalence and Effects on Somatic Cell Count. En Chaiyabutr, N., (Ed.), *Milk Production-An Up-to-Date Overview of*

- Animal Nutrition, Management and Health*. (pp 359-374). InTech. Open science. DOI <https://dx.doi.org/10.5772/51032>.
- Castellano, A., Issaly, L., Iturrioz, G., Mateos, M. y Terán, J. (2009). Análisis de la Cadena de la Leche en Argentina. Estudios Socioeconómicos de los Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales N°4, Ediciones INTA. ISSN 1852-4605.
- Castro, A. 1999. *Producción Bovina*. (1era ed. 3ra reimpresión) San José, Costa Rica: Edición. EUNED.
- Castro, S. *Pérdidas económicas por mastitis en tambos de Argentina*. Publicado el 12 de octubre de 2018. Recuperado el: 1 de abril de 2019 en <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/perdidas-economicas-mastitis-tambos-t40820.htm>.
- Cerioli, M.F., Moliva, M.V., Cariddi, L.N. y Reinoso, E.B. (2018). Effect of the Essential Oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling and Limonene on Biofilm Production in Pathogens Causing Bovine Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*: 5: 146. DOI <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00146>.
- Chandler, R.L. (1970). Experimental bacterial mastitis in the mouse. *Journal of Medical Microbiology*: 3 (2): 273-282. DOI <https://doi.org/10.1099/00222615-3-2-273>.
- Chinchali, J.F., Kaliwal B.B. (2014). Histopathology of mammary gland in *Staphylococcus aureus* induced mastitis in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4suppl1.S320-S325. DOI [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60463-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60463-1).
- Chaves, J. (2010). Mastitis bovina: su control y prevención es una tarea permanente. Disponible en http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/mastitis_bovina.htm.pdf (consultado el día 26 de abril de 2019).
- Choi, S.Y., Hwang, J.H., Ko, H.C., Park, J.G. y Kim, S.J. (2007). Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF- κ B and ROS production in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*: 113 (1): 149-155. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.021>.
- Chou, S. T., Lai, C. P., Lin, C. C. y Shih, Y. (2012). Study of the chemical composition, antioxidant activity and anti-inflammatory activity of essential oil from *Vetiveria zizanioides*. *Food Chemistry*: 134 (1): 262-268. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.131>.
- Chou, S. T., Peng, H. Y., Hsu, J. C., Lin, C. C., & Shih, Y. (2013). *Achillea millefolium* L. essential oil inhibits LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*: 14 (7): 12978-12993. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms140712978>.
- Clewell, D.B. (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 9 (2): 90-102.
- Coelho, S.M., Reinoso, E., Pereira, I.A., Soares, L.C., Demo, M., Bogni, C. y Souza, M. (2009). Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*: 29 (5): 369-374. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500002>.
- Corbellini, C.M. (2002). La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de leche. Memorias III Seminario Internacional sobre competitividad en carne y leche, Colanta Medellín, Colombia (pp. 251-265).
- Crowell P.L., 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *The Journal of Nutrition*: 129 (3): 775-778. DOI <https://doi.org/10.1093/jn/129.3.775S>.
- De Feo, V., Ricciardi, A.I., Biscardi, D. y Senatore, F. (1998). Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*: 10 (1): 61-65. DOI <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700839>.
- Demo, M., Oliva, M., Lopez, M., Zunino, P. y Zygadlo, J. (2005). Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical Biology*. 43 (2): 129-134. DOI <https://doi.org/10.1080/13880200590919438>.
- Di Gioia, M. y Zanoni, I. (2015). Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. *Molecular Immunology*: 63 (2): 143-152. DOI <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.008>.

- Dimitri, M.J. (1980). Descripción de las especies cultivadas en la Argentina. En Dimitri, M.J., (Ed.). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, Buenos Aires, Argentina: Editorial ACME.
- Eaton, T.J. y Gasson. M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*: 67 (4): 1628-1635. DOI <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001>.
- Eaton, T.J., y Gasson. M.J. (2002). A variant enterococcal surface protein Esp(fm) in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiology Letters*: 216 (2): 269-275. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11446.x>.
- El-Sakhawy, F.S., El-Tantawy, M.E., Ross, S.A. y El-Sohly M.A. (1998). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya exotica* L. *Flavour and Fragrance Journal*: 13 (1): 59-62. DOI [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199801/02\)13:1<59::AID-FFJ693>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199801/02)13:1<59::AID-FFJ693>3.0.CO;2-L).
- Erbas, G., Parin, U., Turkyilmaz, S., Ucan, N., Ozturk, M. y Kaya. O. (2016). Distribution of Antibiotic Resistance Genes in *Enterococcus* spp. Isolated from Mastitis Bovine Milk. *Acta Veterinaria*: 66 (3): 336-346. DOI:10.1515/acve-2016-0029.
- Escobar, F. (2004). *Análisis de la capacidad citotóxica de aislamientos clínicos humanos de Helicobacter pylori y evaluación de derivados de Minthostachys verticillata para inhibir la toxina VacA y/o al microorganismo productor*. Trabajo Final para optar al Título de Microbiólogo. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Escobar, F.M., Cariddi, L.N., Sabini, M.C., Reinoso, E., Sutil, S.B., Torres, C.V., Zanon, S.M. y Sabini. L.I. (2012). Lack of cytotoxic and genotoxic effects of *Minthostachys verticillata* essential oil: Studies *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*: 50 (9): 3062-3067. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.018>.
- Escobar, F.M., Sabini, M.C., Cariddi, L.N., Sabini, L.I., Mañas, F., Cristofolini, A., Bagnis, G., Gallucci, M.N. y Cavaglieri. L.R. (2015). Safety assessment of essential oil from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling (peperina): 90-Days oral subchronic toxicity study in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*: 71 (1): 1-7. DOI <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.11.001>.
- Fainboim, L., y Geffner, J. (2017). *Introducción a la inmunología humana*. (6ta ed. 3ra reimpresión) Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Fentem, J.H. (1994). The use of human tissues *in vitro* toxicology, Stirling, 28/29 April 1993 Summary of general discussions. *Human and experimental toxicology*: 13 (6), 445-449. DOI <https://doi.org/10.1177/096032719401300614>.
- Fester, G.A., Martinuzzi, E.A., Retamar, J.A., y Ricciardi, A.I. (1961). *Aceites Esenciales de la República Argentina*. Córdoba, Argentina: Editorial Academia Nacional de Ciencias.
- Finch, J.M., Hill, A.W., Field, T.R. y Leigh. J.A. (1994). Local vaccination with killed *Streptococcus uberis* protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain. *Infection and Immunity*: 62 (9): 3599-3603.
- Forsberg, N.E., Wang, Y.Q., Corbett, R.B., James, D. y Chapman. J.D. (2012). Neutrophil Killing Efficacy of *Streptococcus uberis* Explored. http://phibromarketing.s3.amazonaws.com/_documents/201506/2eda551659ac10b30537e94ae5d3de7f.pdf.
- Gamberale, R., 2005. Ontogenia: generación del repertorio B y T. En: Fainboim, L., y Geffner, J. (Eds.) *Introducción a la Inmunología Humana*. Capítulo 7. (5ta ed). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L.H., Craft, J. y Yin. Z. (2003). $\gamma\delta$ T cells provide an early source of interferon γ in tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*: 198 (3): 433-442.
- García Hernández, M., Guerrero Ramírez, G., Castro Corona, M.D.L.Á. y Medina de la Garza. C.E. (2009). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Medicina Universitaria*: 11 (45): 247-259.
- Gasque Gómez, R. (2008). *Enciclopedia bovina*. (1ra ed). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Ciudad Universitaria México.

- Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I. López. J.M. (2002). Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*: 43 (4): 221. DOI <https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-221>.
- Giannechini, R.E., Matto, C., Gonzales, S. y Rivero. R. (2011). Efecto de inmodulen en el tratamiento de vacas lecheras durante el periodo seco-eficacia en mastitis. Uruguay: Congreso Latinoamericano de Buiatría- Paysandú.
- Gilmore, M.S., Segarra, R A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R. y Clewell. D.B. (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *Journal of Bacteriology*: 176 (23): 7335-7344. DOI <https://doi.org/10.1128/jb.176.23.7335-7344.1994>
- Giordano, A., Perugini, J., Kristensen, D. M., Sartini, L., Frontini, A., Kajimura, S., Kristiansen, K. y Cinti, S. (2017). Mammary alveolar epithelial cells convert to brown adipocytes in post-lactating mice. *Journal of Cellular Physiology*: 232 (11): 2923-2928. DOI <https://doi.org/10.1002/jcp.25858>.
- Gjorevski, N. y Nelson. C.M. (2011). Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 12 (9): 581-593. DOI <https://doi.org/10.1038/nrm3168>.
- González Pereyra, M.L., Cariddi, L.N., Ybarra, F., Isola, M.C., Demo, M.S., Sabini, L. y Maldonado. A.M. (2005). Immunomodulating properties of *Minthostachys verticillata* on human lymphocytes and basophils. *Revista Alergia México*: 52 (3): 105.
- Greeff, A., Zadoks, R., Ruuls, L., Toussaint, M., Nguyen, T. K. A., Downing, A., Rebel, J., Stockhofe-Zurwieden, N. y Smith. H. (2013). Early host response in the mammary gland after experimental *Streptococcus uberis* challenge in heifers. *Journal of Dairy Science*: 96 (6): 3723-3736. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6320>.
- Günther, J., Czabanska, A., Bauer, I., Leigh, J. A., Holst, O. y Seyfert. H.M. (2016). *Streptococcus uberis* strains isolated from the bovine mammary gland evade immune recognition by mammary epithelial cells, but not of macrophages. *Veterinary Research*: 47 (1): 13. DOI <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0287-8>.
- Guo, Y.F., Xu, N.N., Sun, W., Zhao, Y., Li, C.Y. y Guo, M.Y. (2017). Luteolin reduces inflammation in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis by inhibiting NF- κ B activation and MMPs expression. *Oncotarget*: 8 (17): 28481.
- Gürler, H., Findik, A., Gultekin, N., Ay, S.S., Çiftçi, A., Koldaş E., Arslan, S. y Findik. M. (2015). Investigation on the Etiology of Subclinical Mastitis in Jersey and Hybrid Jersey Dairy Cows. *Acta Veterinaria-Beograd*: 65 (3): 358-370. DOI <http://dx.doi.org/10.1515/acve-2015-0030>.
- Guzman, E., Hope, J., Taylor, G., Smith, A. L., Cubillos-Zapata, C. y Charleston. B. (2014). Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. *The Journal of Immunology*: 193 (1): 208-222. DOI <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1303398>.
- Hadrich, J., Wolf, C., Lombard, J. y Dolak. T. (2018). Estimating milk yield and value losses from increased somatic cell count on US dairy farms. *Journal of Dairy Science*: 101 (4): 3588-3596. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13840>.
- Hansen, P.J., Soto, P. y Natzke. R.P. (2004). Mastitis and fertility in cattle—possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *American Journal of Reproductive Immunology*: 51 (4) 294-301. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00160.x>.
- Hens, J.R. y Wysolmerski J.J. (2005). Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Research*: 7 (5) 220. DOI <https://doi.org/10.1186/bcr1306>.
- Herráez C., 2008. *Lactococcus lactis* productores de pediocina pa-1 y enterococos aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos. Facultad de veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos, Madrid.
- Hill, A.W., Finch, J.M., Field, T.R. y Leigh. J.A. (1994). Immune modification of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis in the dairy cow. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*: 8 (2): 09-117. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1994.tb00432.x>.
- Hillerton, J.E. y Booth. J.M. (2018). The Five-Point Mastitis Control Plan-A Revisory Tutorial!. In *NMC Annual Meeting Proceedings*.

- Hogeveen, H., Huijps, K. y Lam. T.J.G.M. (2011). Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zealand Veterinary Journal*: 59 (1): 16-23. DOI <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>.
- Hopster, H., van der Werf, J.T. y Blokhuis. H.J. (1998). Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 66 (1): 83-97. DOI [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00189-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00189-5).
- Hu, S., Concha, C., Lin, F. y Waller. K.P. (2003). Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 91 (1): 29-37. DOI [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00264-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00264-7).
- Huycke, M.M., Gilmore, M.S., Jett, B.D. y Booth. J.L. (1992). Transfer of pheromone-inducible plasmids between *Enterococcus faecalis* in the Syrian hamster gastrointestinal tract. *Journal of Infectious Diseases*: 166 (5): 1188-1191. DOI <https://doi.org/10.1093/infdis/166.5.1188>.
- Huynh, H.T., Robitaille, G. y Turner. J.D. (1991). Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an *in vitro* model for bovine lactation. *Experimental Cell Research*: 197 (2): 191-199. DOI [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90422-Q](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90422-Q).
- Jiang, K.F., Zhao, G., Deng, G.Z., Wu, H C., Yin, N N., Chen, X.Y., Qiu C-W. y Peng. X.L. (2017). Polydatin ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice via inhibiting TLR2-mediated activation of the p38 MAPK/NF- κ B pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*: 38 (2): 211. DOI <https://doi.org/10.1038/aps.2016.123>.
- Johnston, L.M. y Jaykus. L.A. (2004). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Applied and Environmental Microbiology*: 70 (5): 3133-3137. DOI <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.3133-3137.2004>.
- Juarez M.; Van Baren C.M.; Rosselot V.; Di Leo Lira P.; Martinez A.; Retta D.; Elechosa M.; Bandoni, A. (2018). Diferencias en la composición de los aceites esenciales de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling (peperina) y *Hedeoma multiflora* Benth. (peperina de las lomas), en poblaciones de San Luis. *Dominguezia ISSN 1669-6859*. 34: 53.
- Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M. y Handa. H. (2005). Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxidants and Redox Signaling*: 7 (3-4): 395-403. DOI <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.395>.
- Kateete, D.P., Kabugo, U., Baluku, H., Nyakarahuka, L., Kyobe, S., Okee, M., Najjuka, C.F. y Joloba, M.L. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. *PloS One*: 8 (5): e63413. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063413>.
- Kawai, T. y Akira. S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*: 11 (5): 373. DOI 10.1038/ni.1863.
- Kawasaki, T. y Kawai. T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*: 5: 461. DOI <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
- Kerr, D. E. y Wellnitz. O. (2003). Mammary expression of new genes to combat mastitis. *Journal of Animal Science*: 81 (15_suppl_3): 38-47. DOI https://doi.org/10.2527/2003.81suppl_338x.
- Khazandi, M., Eats, P., Trott, D., Ebrahimie, E., Perry, J., Hickey, E., Page, S., Garg, S. y Petrovski. K.R. (2015). Development of an improved *Streptococcus uberis* experimental mastitis challenge model using different doses and strains in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Research*: 82 (4): 470-477. DOI <https://doi.org/10.1017/S0022029915000321>.
- Kim, K.N., Ko, Y.J., Yang, H.M., Ham, Y.M., Roh, S.W., Jeon, Y J., Ahn, G., Kang, M-C., Yoon, W-J., Kim, D. y Oda. T. (2013). Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF- κ B signaling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Food and Chemical Toxicology*: 57: 26-131. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.017>.
- Komori, H.K., Meehan, T.F. y Havran. W.L. (2006). Epithelial and mucosal $\gamma\delta$ T cells. *Current Opinion in Immunology*: 18 (5): 534-538. DOI <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.06.001>.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., Mahdouani, K., Hentati, H. y Bakhrouf. A. (2011). Antibiotic resistance and adhesion properties of oral *Enterococci* associated to dental caries. *BMC Microbiology*: 11 (1): 155. DOI 10.1186/1471-2180-11-155.

- Krause, S., Brock, A. y Ingber, D.E. (2013). Intraductal injection for localized drug delivery to the mouse mammary gland. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*: (80), e50692. DOI: <https://doi.org/10.3791/50692>.
- Lamien-Meda, A., Schmiderer, C., Lohwasser, U., Börner, A., Franz, C. y Novak, J. (2010). Variability of the essential oil composition in the sage collection of the Genebank Gatersleben: a new viridiflorol chemotype. *Flavour and Fragrance Journal*: 25 (2): 75-82. DOI <https://doi.org/10.1002/ffj.1969>.
- Langenegger, J., Viani, M.C.E. y Bahia, M.G. (1981). Effect of the etiological agent of subclinical mastitis on milk production. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 1: 47-52.
- Langoni, H., Penachio, D.S., Citadella, J.C.C., Laurino, F., Faccioli-Martins, P.Y., Lucheis, S.B., Menozzi, B.D. y Silva, A.V., (2011). Microbiological aspects and quality of bovine milk. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31: 1059-1065.
- Larson, B.L. (1985). *Lactation*. (1ra ed.). Iowa State University Press. ISBN-10:9780813810638.
- Lasagno, M.C., Reinoso, E.B., Dieser, S.A., Calvino, L.F., Buzzola, F., Vissio, C., Bogni, C.I. y Odierno, L.M. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine subclinical mastitis in Argentinean dairy farms. *Revista Argentina de Microbiología*: 43: 212-217.
- Lasagno, M.C., Vissio, C., Reinoso, E.B., Raspanti, C.G., Yaciuk, R., Larriestra, A.J. y Odierno, L.M. (2012). Development of an experimentally induced *Streptococcus uberis* subclinical mastitis in goats. *Veterinary Microbiology*: 154 (3-4): 376-386.
- Leendertse, M., Willems, R.J., Giebelen, I. A., van den Pangaart, P.S., Wiersinga, W.J., de Vos, A.F., Florquin, S., Bontenm M.J.M. y van der Poll. T. (2008). TLR2-dependent MyD88 signaling contributes to early host defense in murine *Enterococcus faecium* peritonitis. *The Journal of Immunology*: 180 (7): 4865-4874. DOI: <http://sci-hub.tw/10.4049/jimmunol.180.7.4865>.
- Liu, W. y Saint, D.A. (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry*: 302 (1): 52-59. DOI <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5530>.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*: 25 (4): 402-408. DOI <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lockhart, E., Green, A.M. y Flynn, J.L. (2006). IL-17 production is dominated by $\gamma\delta$ T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of Immunology*: 177 (7): 4662-4669.
- Maeda, H., Yamazaki, M. y Katagata, Y. (2013). Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil inhibits LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*: 77 (3): 482-486. DOI <https://doi.org/10.1271/bbb.120692>.
- Maino, V.C., Suni, M.A. y Ruitenber, J.J. (1995). Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry*: 20 (2): 127-133. DOI <https://doi.org/10.1002/cyto.990200205>.
- Maldonado, A.M., Calvo, D., Cariddi, L.N. y Demo, M. (2001). Efectos linfoproliferativos y antimicrobianos de productos vegetales derivados de *Minthostachys verticillata* y *Achyrocline satureioides*. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*: 32, 82.
- Malinowski, E. (2002). The use of some immunomodulators and non-antibiotic drugs in a prophylaxis and treatment of mastitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*: 5 (3): 197-202.
- Markiewicz, E., Fan, X., Mustafi, D., Zamora, M., Roman, B.B., Jansen, S. A., Macleod, K., Conzen, S.D. y Karczmar, G.S. (2015). High resolution 3D MRI of mouse mammary glands with intra-ductal injection of contrast media. *Magnetic Resonance Imaging*: 33 (1): 161-165. DOI <https://doi.org/10.1016/j.mri.2014.08.035>.
- Medhurst, A.D., Harrison, D.C., Read, S.J., Campbell, C.A., Robbins, M.J. y Pangalos, M.N. (2000). The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *Journal of Neuroscience Methods*: 98 (1): 9-20. DOI [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00178-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00178-3).

- Mendonça, P.H.B., da Rocha, R.F.D.B.D., Moraes, J.B.D.B., LaRocque-de-Freitas, I.F., Logullo, J., Morrot, A., Nunes, M.P., Freire-de-Lima, C.G. y Decote-Ricardo, D. (2017). Canine Macrophage DH82 Cell Line As a Model to Study Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection. *Frontiers in Immunology*: 8: 604. DOI <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00604>.
- Miles, A.A., Misra, S.S. e Irwin, J.O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*: 38 (6): 732-749. DOI <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>.
- Mitra, S.D., Shome, B.R., Mani, B., Velu, D., Banerjee, A., Bankar, K., Ghosh, S.K., Santra, S., Suresh, K.P. y Rahman, H. (2016). *Streptococcus uberis* ST439 and ST475 induce differential inflammatory responses in a mouse intramammary infection model. *Gene*: 585 (2): 247-255. DOI <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.054>.
- Moncada, S. (1999). Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine*: 92 (4): 164-169.
- Montironi, I.D., Decote-Ricardo, D., Ferreira La Roque de Freitas, I., Freire-de-Lima, C.G., Reinoso, E.B. y Cariddi, L.N. (2016a). Modulator effects of the essential oil of *Minthostachys verticillata* on macrophage functions. *Revista Medicina*: 76 (Suplemento I): 253, (resumen 550).
- Montironi, I.D., Cariddi, L.N. y Reinoso, E.B. (2016b). Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Argentina de Microbiología*: 48 (3): 210-216. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.005>.
- Montironi, I.D., Raviolo, J., Bagnis, G., Porporatto, C., Cariddi, L. y Reinoso, E.B. (2016c). Desarrollo de un modelo murino de mastitis para la evaluación de un inmunomodulador natural. Resumen publicado en libro de resúmenes, ISBN 978-987-42-2403-3. 2016, página 80, (resumen 168). Asociación de Biología de Tucumán XXXIII Jornadas Científicas. Tafí del Valle, Tucumán, 27 y 28 de octubre de 2016.
- Morimoto, K., Kanda, N., Shinde, S. e Isobe, N. (2012). Effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine on innate immune function of bovine mammary gland infused with lipopolysaccharide. *Journal of Dairy Science*: 95 (9): 5067-5074. DOI <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5498>.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*: 65 (1-2): 55-63. DOI [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Mukherjee, R., De, U.K. y Ram, G.C. (2010). Evaluation of mammary gland immunity and therapeutic potential of *Tinospora cordifolia* against bovine subclinical mastitis. *Tropical Animal Health and Production*: 42 (4): 645-651. DOI <http://sci-hub.tw/10.1007/s11250-009-9471-z>.
- Mukherjee, S., Karmakar, S. y Babu, S.P.S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*: 20 (2): 193-204. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.011>.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F. y Gilmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*: 13 (4): 513-522. DOI <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.513>.
- Muñoz, F. (1987). *Plantas Medicinales y Aromáticas*. Madrid, España: Editorial Mundi Prensa. pp 15-23.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB (Federation of American Societies For Experimental Biology) journal*: 6 (12): 3051-3064. DOI <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.12.1381691>.
- Niemialtowski, M., Nonnecke, B.J. y Targowski, S.P. (1988). Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis. *Journal of Dairy Science*: 71 (3): 780-787. DOI [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79618-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79618-6).
- Nishimura, T. (2003). Expression of potential lymphocyte trafficking mediator molecules in the mammary gland. *Veterinary Research*: 34 (1): 3-10. DOI <https://doi.org/10.1051/vetres:2002045>.
- Notebaert, S. y Meyer, E. (2006). Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review. *Veterinary Quarterly*: 28 (1): 2-13. DOI <https://doi.org/10.1080/01652176.2006.9695201>.

- Núñez, M.E., (1982). *Plantas Medicinales de Costa Rica y su folclore*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica. pp 318.
- Núñez, C. y Cantero, J.J. (2000). *Las plantas Medicinales del Sur de la Provincia de Córdoba*. Río Cuarto, Córdoba, Argentina: Editorial De la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. pp. 1-144.
- Oakes, S.R., Hilton, H.N. y Ormandy, C.J. (2006). The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. *Breast Cancer Research: BCR*: 8 (2): 207. DOI <https://doi.org/10.1186/bcr1411>.
- Odierno, L., Calvino, L., Traverssa, P., Lasagno, M., Bogni, C. y Reinoso, E. (2006). Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. *Journal of Dairy Science*: 89 (10): 3886-3890. DOI. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72431-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72431-6).
- Ojeda, M., Coirini, R., Cosiansi, J., Zapata, R. y Zygadlo, J. (2001). Evaluation of variability in natural populations of peperina (*Minthostachys mollis* (kunth) Griseb.), an aromatic species from Argentina. *Plant Genetic Resources Newsletter*: 126: 27-30.
- Oliva, M.M. (2005). *Análisis de actividad antimicrobiana de aceites esenciales y sus componentes puros obtenidos de plantas medicinales*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Oliva, M.M., Carezzano, M.E., Gallucci, M.N. y Demo, M.S. (2011). Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. *Natural Product Communications*: 6 (7): 1934578X1100600729. DOI <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600729>.
- Oliveira, S.S., Póvoa, D.C., Dos Santos Nascimento, J., do Sv Pereira, M., De Siqueira Jr, J.P. y de Freire Bastos, M.D.C. (1998). Antimicrobial substances produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*: 27 (4): 229-234. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00413.x>.
- Oliveira, C.M.C., Sousa, M.G.S., Silva, N.D.S., Mendonça, C.L., Silveira, J.A.S., Oaigen, R.P., Andrade, S.J.T. y Barbosa, J. D. (2011). Prevalence and etiology of bovine mastitis in the dairy region of Rondon do Pará, state of Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*: 31 (2): 104-110. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000200002>.
- Østerås, O., Sølverød, L. y Reksen, O. (2006). Milk culture results in a large Norwegian survey—effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *Journal of Dairy Science*: 89 (3): 1010-1023. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72167-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72167-1).
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J.J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., Bravo-Patino, A. y Baizabal-Aguirre, V.M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*: 54 (4): 399-409. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.06.010>.
- Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X. y Lee, J.W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*: 34 (5): 597-627. DOI <https://doi.org/10.1051/vetres:2003024>.
- Petersson-Wolfe, C.S., Wolf, S L. Hogan, J.S. (2009). Experimental challenge of bovine mammary glands with *Enterococcus faecium* during early and late lactation. *Journal of Dairy Science*: 92 (7): 3158-3164. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1755>.
- Petersson-Wolfe, C.S. y Currin, J.F. (2012). Environmental Streptococci and Enterococcus spp.: A Practical Summary for Controlling Mastitis. Virginia Cooperative Extension programs publication DASC-7P.
- Philpot, W.N. y Nickerson, S.C. (1992). *Mastitis: el Contraataque*. (3ra ed.) Co. Naperville, Illinois, USA: International Babson Bros.
- Primo, V., Rovera, M., Zanon, S., Oliva, M., Demo, M., Daghero, J. y Sabini, L. (2001). Determinación de la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb.). Epling. *Revista Argentina de Microbiología*: 33, 113-117.
- Prokesch, A., Smorlesi, A., Perugini, J., Manieri, M., Ciarmela, P., Mondini, E., Trajanoski, Z., Kristiansen, K., Giordano, A., Bogner-Strauss, J. G. y Cinti, S. (2014). Molecular aspects of

- adipoepithelial transdifferentiation in mouse mammary gland. *Stem Cells*: 32 (10): 2756-2766. DOI <https://doi.org/10.1002/stem.1756>.
- Quesnell, R.R., Klaessig, S., Watts, J.L. y Schukken. Y.H. (2012). Bovine intramammary *Escherichia coli* challenge infections in late gestation demonstrate a dominant antiinflammatory immunological response. *Journal of Dairy Science*: 95 (1): 117-126. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4289>.
- Rainard, P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research*: 34 (5): 647-670. DOI <https://doi.org/10.1051/vetres:2003025>.
- Rainard, P. y Riollat. C. (2003). Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction Nutrition Development*: 43 (5): 439-457. DOI <https://doi.org/10.1051/rnd:2003031>.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P. y Nakoinz. I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*: 15 (1): 261-267. DOI [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90101-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90101-0).
- Rasooly, R., Do, P.M. y Friedman. M. (2010). Inhibition of biological activity of staphylococcal enterotoxin A (SEA) by apple juice and apple polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 58 (9): 5421-5426. DOI <https://doi.org/10.1021/jf904021b>.
- Ratera, E.L., Ratera, M.O. (1980). Plantas que curan. En Ratera, E.L. y Ratera, M.O. (Eds.), *Plantas de la Flora Argentina Empleadas en Medicina Popular*. (pp 43-85). Buenos Aires, Argentina: Editorial Hemisferio Sur.
- Redpath, S., Ghazal, P. y Gascoigne. N.R. (2001). Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends in Microbiology*: 9 (2): 86-92. DOI [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01919-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01919-3).
- Reinoso, E. (1997). *Estudios de virulencia de una mutante aislada a partir de una cepa de S. aureus de origen bovino*. Trabajo Final. 1997 para optar al Título de Microbiólogo. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Reinoso, E., Magnano, G., Giraud, J., Calzolari, A. y Bogni. C. (2002). Bovine and rabbit models for the study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant strain, RC122. *Canadian Journal of Veterinary Research*: 66 (4): 285.
- Reinoso, E., Bettera, S., Frigerio, C., DiRenzo, M., Calzolari, A. y Bogni. C. (2004a). RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiological Research*: 159 (3): 245-255. DOI <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.04.002>.
- Reinoso, E.B., Odierno, L.M., Raspanti, C.G. y Bogni. C.I. (2004b). Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolated from food samples. Trabajo in extenso. Simposio Internacional de Biotecnología. II Simposio Argentino-Italiano de Bacterias Lácticas. Tucumán.
- Reinoso, E., Maffini D., Raspanti, C., Lasagno, M., Calvino, L. y Odierno. L. (2005). Identification by RFLP, at level of species of *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *BIOCELL*: 28 (2):195, (resumen 90). ISSN: 0327-9545.
- Reinoso, E.B., Ibañez, F., Raspanti, C., Odierno, L. y Bogni. C.I. (2006). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from humans normal flora and infections in Argentina. *Journal of Basic Microbiology*: 46 (4): 286-293. DOI <https://doi.org/10.1002/jobm.200510100>.
- Reinoso, E., Bettera, S., Odierno, L. y Bogni. C. (2007). Rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*: 44 (supl), 115-121.
- Reinoso, E.B., Lasagno, M.C., Tirante, L., Ferrari, M.P. y Odierno. L.M. (2009) Pulse Field Gel Electrophoresis of *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. VI Congreso Argentino de Microbiología General. Villa Carlos Paz. Octubre 2009.
- Reinoso, E., Lasagno, M., Dierker, S. y Odierno. L. (2011a). Distribution of virulence associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiology Letters*: 318 (2): 183-188. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02258.x>.
- Reinoso, E., Fambrini, A., Lasagno, M. y Odierno. L. (2011b). Biofilm production by *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *BIOCELL*: 35: 118, (resumen MI-P46). ISSN 0327 - 9545 (print) - ISSN 1667 - 5746 (electronic).

- Reinoso, E.B. (2017). Bovine Mastitis Caused by *Streptococcus uberis*: Virulence Factors and Biofilm. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*: 9 (5): 237-243. DOI <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000371>.
- Reneau, J.K. y Packard. V.S. (1991). Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*: 11: 4-11.
- Rowson, A.D., Wang, Y.-Q., Aalseth, E., Forsberg, N.E. Y Puntteney. S.B. (2010). Effects of an immunomodulatory feed additive on the development of mastitis in a mouse infection model using four bovine-origin isolates. *Animal*: 5 (2): 220-229. DOI <https://doi.org/10.1017/S1751731110001850>.
- Sabroe, I., Dower, S.K. y Whyte, M.K. (2005). The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clinical Infectious Diseases*: 41 (Supplement_7): S421-S426. DOI <https://doi.org/10.1086/431992>.
- Sagrera Ferrandiz, J. (1993). *Plantas Medicinales. Tratamiento de las Enfermedades Por Medio de las Plantas*. Bogotá, Colombia: Latros Ediciones Ltda.
- Sanchez, C., Suero, M., Castignani, H., Terán, J.C. y Marino. M. (2012). La lechería argentina: estado actual y su evolución (2008 A 2011). Trabajo presentado en el marco del Proyecto Específico “Gestión de la Información y Modelización en Lechería Bovina (52-071092). PAN Leches. INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-la_lecheria_argentina_estado_actual_y_su_evolucion.pdf. Visitado 6 de febrero de 2019.
- Schmidt-Lebuhn, A. N. (2008). Review: Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*: 118 (3): 343-53. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.030>.
- Schroeder, J.W. (2012). Mastitis Control Programs: Bovine Mastitis and Milking Management. North Dakota State University Fargo, North Dakota. Available from: <https://library.ndsu.edu/ir/bitstream/handle/10365/5362/as1129.pdf?sequence=1>
- Schukken, Y.H., Tikofsky, L.L. y Zadoks. R.N. (2005). Environmental control for mastitis prevention, milk quality and food safety. En Hogeveen, H., (Ed.), *Mastitis in Dairy Production: Current Knowledge and Future Solutions*. (pp 109-114). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Senatore, F. (1998). Volatile constituents of *Minthostachys setosa* (Briq.) Epl. (Lamiaceae) from Peru. *Flavour and Fragrance Journal*: 13 (4): 263-265. DOI [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(1998070\)13:4<263::AID-FFJ738>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(1998070)13:4<263::AID-FFJ738>3.0.CO;2-H).
- Sillanpää, J., Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Prakash, V.P., Fothergill, T., Ton-That, H. y Murray. B.E. (2010). Characterization of the ebp_{fm} pilus-encoding operon of *Enterococcus faecium* and its role in biofilm formation and virulence in a murine model of urinary tract infection. *Virulence*: 1 (4): 236-246. DOI <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.11966>.
- Silva R.M., Silva R.C., Ribeiro A.B., 2012. Antibiotic residues in milk. *SaBios: Revista de Saúde e Biologia*: 7: 30-44.
- Silvestrini, P., Beccaría, C., Pereyra, E.A.L., Renna, M.S., Ortega, H.H., Calvino, L.F., Dallard, B.E. 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. DOI <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.010>.
- Smith, K.L. y Hogan. J.S. (1993). Environmental mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*: 9 (3): 489-498. DOI [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30616-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30616-2).
- Smith, K.L., Hogan, J.S. y Wooster. O.H. (2003). Environmental mastitis caused by species of *Streptococcus* and *Enterococcus*: risk factors and control. *Ohio Agricultural Research and Development Center The Ohio State University Wooster, USA*.
- Soltys, J. y Quinn. M.T. (1999). Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infection and Immunity*: 67 (12): 6293-6302.
- Sorau, S.B., Bandoni. A.L. (1994). Labiadas. En Sorau, S.B., Bandoni, A.L. (Eds.), *Plantas de la Medicina Popular Argentina*. (pp. 62-64). Buenos Aires, Argentina: Albatros.

- Sordillo, L.M. y Streicher, K.L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*: 7 (2): 135-146.
- Sternlicht, M.D. (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research*: 8 (1): 201. DOI <https://doi.org/10.1186/bcr1368>.
- Strindhall, J., Lindgren, P.E., Löfgren, S. y Kihlström, E. (2005). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* vary in ability to stimulate cytokine expression in human endothelial cells. *Scandinavian Journal of Immunology*: 61 (1): 57-62. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2005.01526.x>.
- Sun, Z., Wang, H., Wang, J., Zhou, L. y Yang, P. (2014). Chemical Composition and Anti-Inflammatory, Cytotoxic and Antioxidant Activities of Essential Oil from Leaves of *Mentha piperita* Grown in China. *PLoS One*: 9 (12): e114767. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114767>.
- Sutil, S.B., Astesano, A., Vogt, V., Torres, C.V., Zanon, S.M. y Sabini, L.I. (2006). *Minthostachys verticillata*: toxicity of its essential oil and major constituents to *Artemia salina* and cell lines. *Molecular Medicinal Chemistry*: 10: 41-2.
- Svoboda, K.P. y Hampson, J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW*: 16: 1-7.
- Tavares, D., Ferreira, P., Vilanova, M., Videira, A. y Arala-Chaves, M. (1995). Immunoprotection against systemic candidiasis in mice. *International immunology*: 7 (5): 785-796. DOI <https://doi.org/10.1093/intimm/7.5.785>.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S. y Shankar, N. (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*: 72 (10): 6032-6039.
- Tenenbaum, T., Spellerberg, B., Adam, R., Vogel, M., Kim, K.S. y Schroten, H. (2007). *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes and Infection*: 9 (6): 714-720. DOI <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.015>.
- Tizard, I.R. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria*. (8va ed.). Barcelona, España: Elsevier. ISBN edición española: 978-84-8086-431-2.
- Trigo, G., Dinis, M., França, Â., Andrade, E.B., da Costa, R.M.G., Ferreira, P. y Tavares, D. (2009). Leukocyte populations and cytokine expression in the mammary gland in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* mastitis. *Journal of Medical Microbiology*: 58 (7): 951-958. DOI <https://doi.org/10.1099/jmm.0.007385-0>.
- Torras, J., Grau, M. D., López, J. F., y de las Heras, F.X.C. (2007). Analysis of essential oils from chemotypes of *Thymus vulgaris* in Catalonia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 87 (12): 2327-2333. DOI <https://doi.org/10.1002/jsfa.2995>.
- Underhill, D.M. y Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Review of Immunology*: 20 (1): 825-852.
- Wallemacq, H., Bedoret, D., Pujol, J., Desmet, C., Drion, P. V., Farnir, F., Mainil, J., Lekeux, P., Bureau, F. y Fiévez, L. (2012). CD40 triggering induces strong cytotoxic T lymphocyte responses to heat-killed *Staphylococcus aureus* immunization in mice: a new vaccine strategy for staphylococcal mastitis. *Vaccine*: 30 (12): 2116-2124. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.039>.
- Waller, K.P. (2002). Mammary gland immunology around parturition. En Mol, J.A., y Clegg, R.A. (Eds.), *Biology of the Mammary Gland*. (pp. 231-245). Boston: Springer.
- Watts, J.L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*: 16 (1): 41-66. DOI [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90126-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90126-5).
- Wellnitz, O., Arnold, E.T. y Bruckmaier, R.M. (2011). Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different immune responses in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*: 94 (11): 5405-5412. DOI <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3931>.
- Zanón, S M., Ceriatti, F.S., Rovera, M., Sabini, L.J. y Ramos, B.A. (1999). Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*: 41 (2): 59-62.

- 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 (7): e0134797. DOI 10.1371/journal.pone.0134797.
- Zwick, R.K., Rudolph, M C., Shook, B A., Holtrup, B., Roth, E., Lei, V., Van Keymeulen, A., Seewaldt, V., Kwei, S., Wysolmerski, J., Rodeheffer, M.S. y Horsley. V. (2018). Adipocyte hypertrophy and lipid dynamics underlie mammary gland remodeling after lactation. *Nature Communications*: 9 (1): 3592. DOI <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05911-0>.
- Zygadlo, J., Maestri, D., Lamarque, A., Guzman, C., Velasco-Negueruela, A., Perez-Alonso, M., Garcia-Vallejos, M. y Grosso. N. (1996). Essential oil variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemical Systematics and Ecology*: 24 (4):319-323.
- Zygadlo, J.A. y Juliani. H.R. (2000). Bioactivity of essential oil components. *Current Topics in Phytochemistry*: 3: 203-214.

ANEXO I:

**Identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial
de *M. verticillata***

Tabla 1: Composición química del aceite esencial de *Minthostachys verticillata*. Se detallan los compuestos identificados con su respectivo porcentaje relativo en cada una de las muestras oleosas obtenidas a partir de dos especímenes de *M. verticillata*.

Compuesto Identificado	<i>AE M. verticillata</i> proveniente de Santa Rosa (Córdoba)		<i>AE M. verticillata</i> proveniente de Villa Larca (San Luis)	
	<i>Tiempos de retención (min.)</i>	<i>Porcentaje relativos (%)</i>	<i>Tiempos de retención (min.)</i>	<i>Porcentaje relativos (%)</i>
<i>δ-careno</i>	10,486	0,39	10,486	0,29
<i>β-pineno</i>	12,136	0,51	12,136	0,40
<i>Limoneno</i>	14,012	1,41	14,002	1,14
<i>Mentona</i>	18,809	60,57	18,634	37,79
<i>Cis-mentona</i>	18,969	3,72	18,879	1,38
<i>Isopulegona</i>	19,254	0,86	19,219	1,15
<i>Ciclohexanone, 2-isopropyl-2,5-dimethyl-</i>	----	----	20,620	1,14
<i>Pulegona</i>	21,455	29,58	21,390	51,66
<i>Piperitona</i>	21,845	1,45	21,810	1,40
<i>Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 2-allyl-1,7,7-trimethyl-</i>	----	----	22,820	0,63
<i>Pipieritenona</i>	24,426	0,50	24,421	1,56
<i>γ-elemeno</i>	28,833	0,39	28,833	0,27
<i>Espatulenol</i>	31,029	0,62	31,029	1,19
Total	----	100	----	100

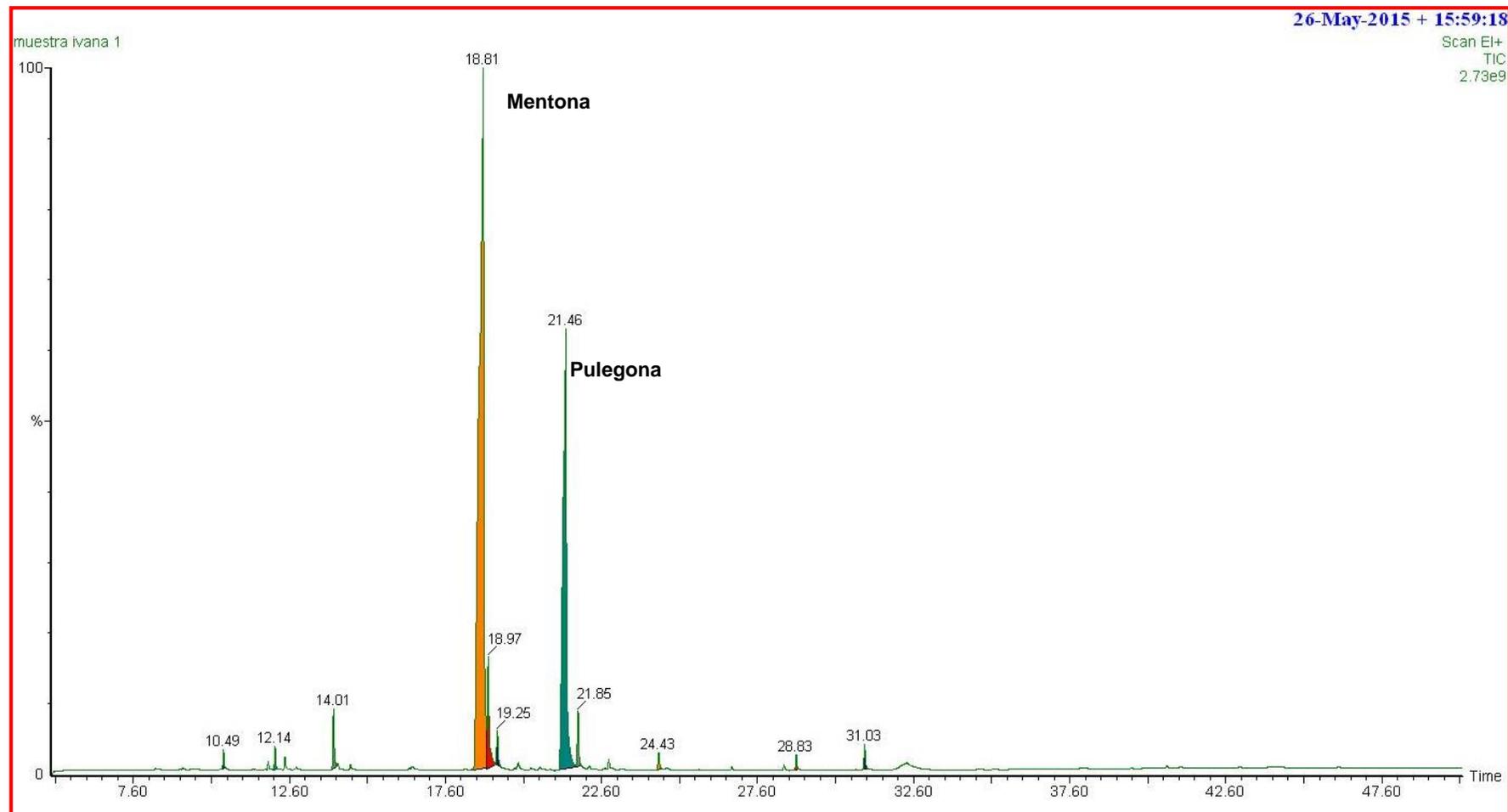


Figura 1: Perfil cromatográfico obtenido por CG-MS del aceite esencial obtenido de la especie *Minthostachys verticillata* proveniente de la localidad de Santa Rosa, Provincia de Córdoba, Argentina. El área representada por los picos, corresponde a las proporciones en las que se encuentra cada componente en dicha mezcla. Se observan los tiempos de retención sobre cada pico.

ANEXO II

**Seguimiento de ratones Balb/c hembras y optimización de la inoculación
intramamaria en un modelo murino**



Figura 1: A) Cajas provistas por el Bioterio donde se mantuvieron los ratones Balb/c hembras durante todo su ciclo de vida. B) Período de apareamiento: se colocaron 4 ratones Balb/c hembras en cajas que permanecieron durante 7 días con 2 machos. Finalizado ese tiempo, los machos se retiraron de las cajas. C) Hembras en periodo de gestación, el cual tiene una duración de 19 a 21 días a partir del día 0 (momento en que se colocaron las hembras y machos juntos).



Figura 2: Sujeción y marcaje de ratones Balb/c hembras en su primer día de lactancia.



Figura 3: Ratones Balb/c hembras. La hembra con marca azul en la nuca está en su primer día de lactancia.

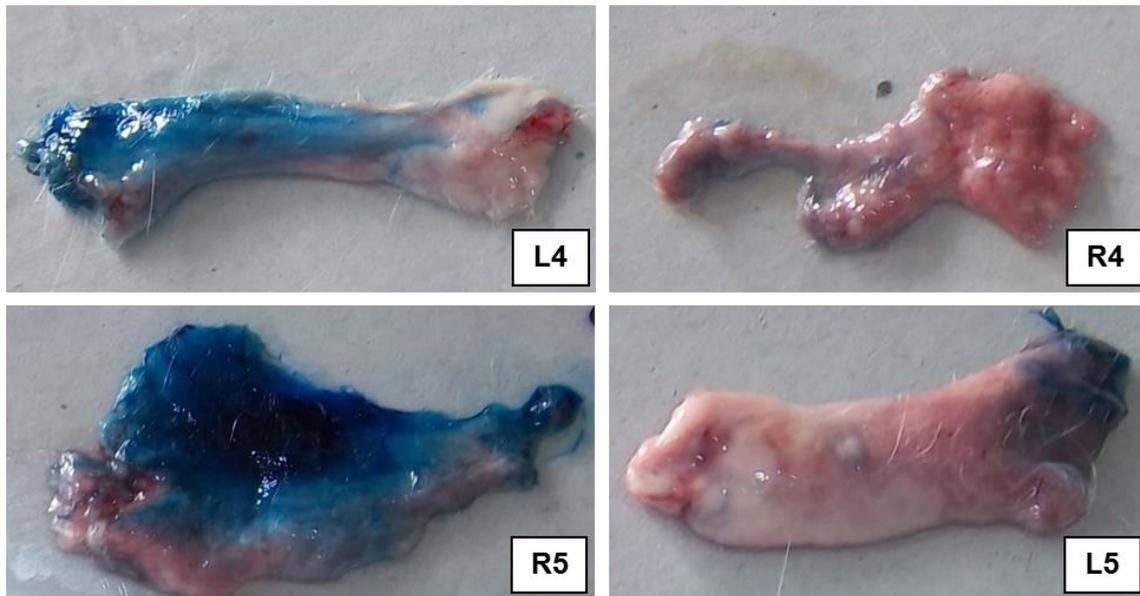


Figura 4: Fotografías representativas de glándulas mamarias de la región abdominal de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia. A la izquierda de la figura se muestran las glándulas L4 y R5 inoculadas con la solución de Azul de Evans al 0,2% y a la derecha las glándulas R4 y L5 no inoculadas. Se observa que el colorante no difundió hacia las glándulas no inoculadas, confirmando la precisión de las inoculaciones intramamarias. n= 2.



Figura 5: Fotografías representativas de glándulas mamarias de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, 72 h post-inoculación con PBS. Glándula mamaria de hembra que **A)** continuó y **B)** no con la lactancia luego de la inoculación. n= 2.

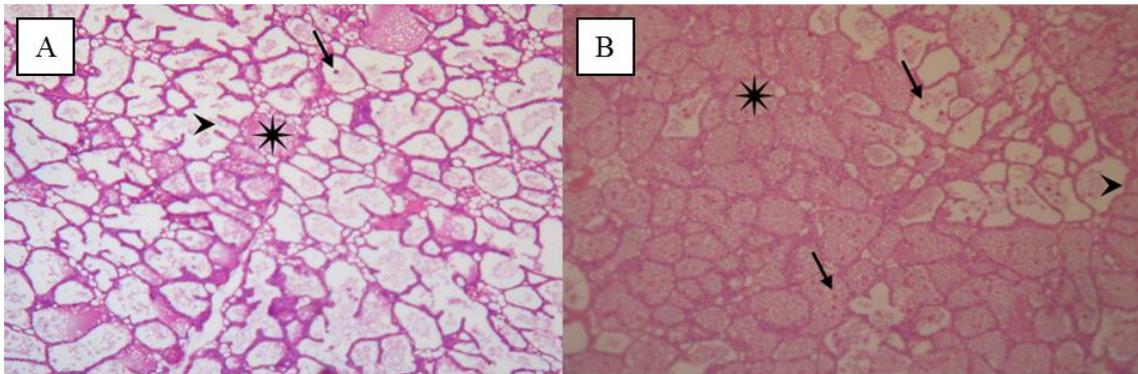


Figura 6: Histopatología de glándulas mamaria de ratones Balb/c hembras con 10-15 días de lactancia, 72 h post-inoculación con PBS. Histopatología de glándula mamaria de hembra que continuó **(A)** y no **(B)** con la lactancia luego de la inoculación. La flecha indica un PMN, la estrella secreción láctea y la punta de flecha, un alveolo. Secciones representativas del tejido mamario. Magnificación 10X. n= 2.

ANEXO III

Curva de crecimiento cepa *E. faecium* EF214

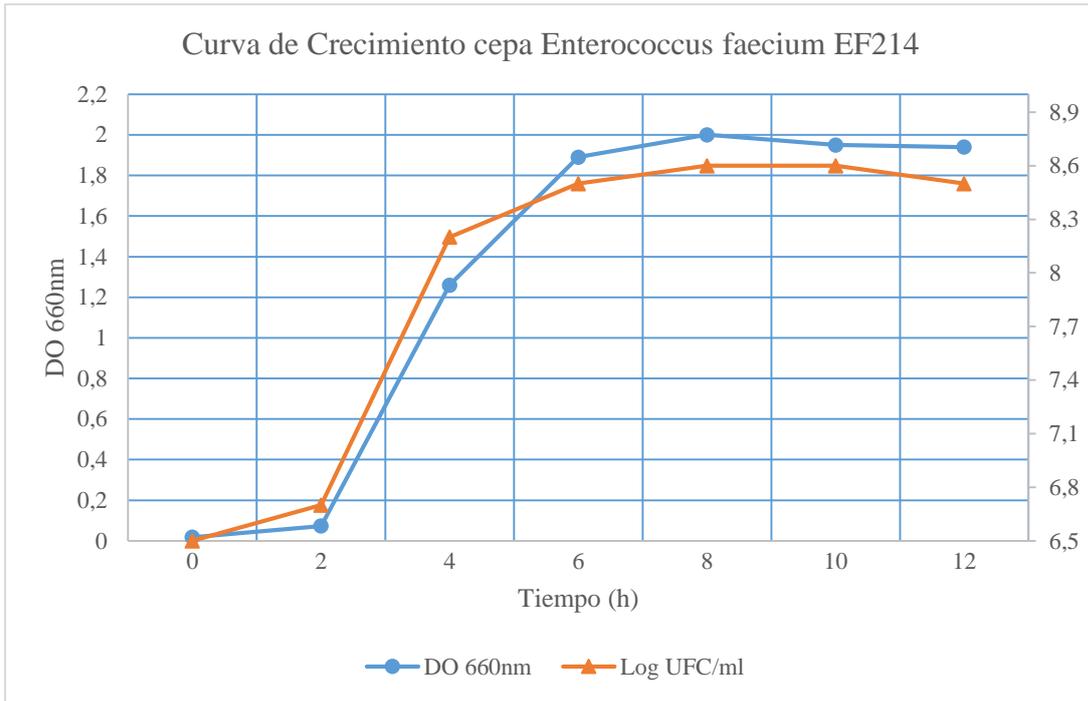


Figura 1: curva de crecimiento de la cepa *E. faecium* EF214.

8. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

8.1. Publicaciones en revistas

Montironi, I.D., Cariddi, L.N. y Reinoso, E.B. (2016). Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Argentina de Microbiología*: 48 (3): 210-216. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.005>.

Montironi, I.D., Reinoso, E.B., Croce, V., Siri, M.I., Pianzola, M.J., Moliva, M., Campra, N., Bagnis, G., Ferreira LaRocque-de-Freitas I., Decote-Ricardo, D., Freire-de-Lima, C.G., Raviolo, J.M. y Cariddi, L.N. (2019). *Minthostachys verticillata* essential oil activates macrophage phagocytosis and modulates the innate immune response in a murine model of *Enterococcus faecium* infection. *Research in Veterinary Science* 125: 333-344. DOI <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.07.015>.

8.2. Resúmenes publicados

Cariddi, L.N, **Montironi, I.D.** y Reinoso, E.B. (2013). Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* y uno de sus compuestos mayoritarios sobre cepas aisladas de mastitis bovina. *Dominguezia XI Simposio Argentino, XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales*: 96 ISSN 1669-6859.

Montironi, I.D., Raviolo, J.M., Bohl, L., Campra, N.A., Bagnis, G., Porporatto, C., Reinoso, E.B. y Cariddi, L.N. (2015). Characterization of effect of dose and exposure time of *Minthostachys verticillata* (griseb.) epling essential oil in cells of bovine and murine mammary gland. *BIOCELL THIRD JOINT MEETING OF THE BIOLOGY SOCIETIES OF ARGENTINA*: 39 (5): abstract A82. ISSN 1667-5746.

Montironi, I.D., Decote-Ricardo, D., Ferreira La Roque de Freitas, I., Freire-de-Lima, C.G., Reinoso, E.B. y Cariddi, L.N. (2016). Modulator effects of the essential oil of *Minthostachys verticillata* on macrophage functions. *Revista Medicina*: 76 (Suplemento I): 253, (resumen 550).

Montironi, I.D., Raviolo, J.M., Moliva, M., Campra, N.A., Bagnis, G., Reinoso, E.B. y Cariddi, L.N. (2017). *Minthostachys verticillata* essential oil modulates the

innate immune response in a mouse mastitis model. *Revista Medicina: 77* Suplemento I: 580, (resumen 1040).

Moliva, M., **Montironi, I.D.**, Campra, N.A., Raviolo, J.M., Cariddi, L.N. Reinoso. E.B. (2017). Pheno and genotypic characterization of an *Enterococcus faecium* strain and its virulence in a murine model of mastitis. *Revista Medicina: 77* Suplemento I: 184, (resumen 877).

Montironi, I.D., Reinoso, E.B., Siri, M.I., Pianzola, M.J., Croce, V., Moliva, M., Campra, N., Raviolo, J.M. y Cariddi. LN. (2018). The role of *Minthostachys verticillata* essential oil in the immune response and its possible application for the prevention of bovine intramammary infections. *Revista Medicina: 78* Suplemento III: 232, (resumen 478).

Montironi, I.D., Moliva, M., Campra, N., Raviolo, J.M. Reinoso, E.B., y Cariddi. LN. (2018). Aplicación del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* como estrategia terapéutica en la prevención de la mastitis bovina. Libro de resúmenes página 89. 40° Congreso Argentino de Horticultura.

8.3. Trabajos enviados a revistas

Montironi, I.D., Moliva, M., Campra, N., Raviolo, J.M., Bagnis, G., Cariddi, LN. y Reinoso. E.B. Phenotypic and genotypic characterization of an *Enterococcus faecium* strain in a murine mastitis model. Trabajo enviado a la revista *Journal of Applied Microbiology*.