



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Investigaciones Histológicas Aplicadas

***“Estudio histofisiológico del efecto de un agente
inmunomodulador intramamario en la involución de la
glándula mamaria bovina”.***

Autora: Bibiana E. Dallard

Director: PhD. Luis F. Calvino

*Tesis presentada para la obtención del título de
Doctor en Ciencias Biológicas
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral*

“Los más grandes adelantos útiles para la medicina, son la consecuencia de investigaciones desinteresadas que no tenían en vista posibles aplicaciones. La preocupación excesiva por lo aplicado acorta la visión y disminuye la fertilidad y el alcance de las investigaciones y los conocimientos. No hay en realidad ciencias puras y ciencias aplicadas, sino ciencias y aplicaciones de las ciencias; estas aplicaciones son inmediatas o llegan más tarde”.

BERNARDO A. HOUSSAY y col.
Fisiología Humana, Bs. As., El Ateneo, 1964.

DEDICATORIA

Con amor a:

Rodrigo y Manuel...

A mis padres...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar un profundo agradecimiento a mi director, Dr. Luis Calvinho, por su buena predisposición, responsabilidad, dedicación y compromiso en la conducción de mis actividades en investigación durante estos años.

A Hugo Ortega, por sus sugerencias, buenos consejos y por esa capacidad de solucionar inconvenientes cuando los tiempos apremian.

A Natalia Salvetti y Celina Baravalle por su colaboración desinteresada en las actividades experimentales de esta tesis.

A mis alumnas pasantes, Valeria Ruffino y Soledad Heffel, que con su afán de aprender estuvieron siempre dispuestas a colaborar en todas las actividades desarrolladas en este trabajo.

A mis amigos y compañeros de la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL, por haberme alentado en este proyecto, por haber estado siempre dispuestos a colaborar y por la infinita paciencia durante todos estos años.

A todos los que directa o indirectamente estuvieron involucrados en el desarrollo de mis actividades de investigación, gracias por favorecer mi crecimiento personal.

No se ni quién ni cuándo alguien me dijo una frase que es muy cierta:

“Cuando te propones firmemente una meta y confías, todo el universo conspira para que se materialice”.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Consideraciones generales.	2
1.2. Agentes inmunomoduladores.	4
<i>1.2.1. Mecanismo de acción.</i>	5
1.3. Modulación de la inmunidad innata	6
1.4. Propiedades inmunomodulatorias de LPS.	7
1.5. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria.	9
<i>1.5.1. Defensas anatómicas.</i>	10
<i>1.5.2. Defensas celulares.</i>	10
<i>1.5.3. Defensas solubles.</i>	15
1.6. Involución de la glándula mamaria.	25
<i>1.6.1. Morfología de la glándula mamaria involucionada.</i>	26
<i>1.6.2. Citología de la secreción láctea durante la involución.</i>	29
<i>1.6.3. Apoptosis e involución mamaria.</i>	30
<i>1.6.4. Control de la involución mamaria.</i>	32
1.6.5. Influencia del sistema de Factores de Crecimiento Análogos a Insulina (IGFs) en la regulación de la involución mamaria.	34
<i>1.6.5.1. Generalidades.</i>	35
<i>1.6.5.2. Participación en la regulación de la involución mamaria.</i>	35
<i>1.6.6. Impacto de la mastitis en la muerte de células epiteliales mamarias.</i>	37
2. OBJETIVOS	39

2.1. General.	39
2.2. Específicos.	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Modificador de la respuesta biológica	42
<i>3.1.1. Ensayo dosis - respuesta</i>	42
3.2. Animales.	43
3.3. Diseño experimental.	43
3.4. Análisis bacteriológicos.	44
3.5. Recuento de células somáticas.	44
3.6. Obtención y procesamiento de las muestras de tejido.	45
3.7. Estudios histoquímicos.	45
<i>3.7.1. Coloración de Azul de Toluidina para identificar mastocitos.</i>	45
<i>3.7.1.1. Solución colorante.</i>	45
<i>3.7.1.2. Procedimiento.</i>	46
<i>3.7.1.3. Resultados.</i>	46
<i>3.7.2. Coloración Rojo Sirius Alcalino – Hematoxilina.</i>	46
<i>3.7.2.1. Soluciones.</i>	46
<i>3.7.2.2. Procedimiento.</i>	46
<i>3.7.2.3. Resultados.</i>	47
3.8. Inmunohistoquímica.	47
<i>3.8.1 Controles.</i>	47
<i>3.8.2. Procedimiento general.</i>	48
3.9. Detección de apoptosis <i>in situ</i>.	50
<i>3.9.1. Procedimiento general.</i>	51
<i>3.9.2. Controles.</i>	51
<i>3.9.3. Preparación de los reactivos.</i>	51
3.10. Análisis de imágenes.	52

3.10.1. <i>Cuantificación de la IHQ.</i>	52
3.10.2. <i>Evaluación morfológica y cuantificación de células infiltrantes.</i>	53
3.10.3. <i>Evaluación de la proliferación celular.</i>	53
3.10.4. <i>Evaluación y cuantificación de la apoptosis.</i>	54
3.11. Análisis estadístico.	54
3.12. Normas éticas y de bioseguridad.	55
4. RESULTADOS	56
4.1. Ensayo dosis – respuesta.	57
4.1.1. <i>Recuento de células somáticas (RCS).</i>	57
4.1.2. <i>Alteraciones clínicas.</i>	58
4.1.3. <i>Temperatura rectal.</i>	58
4.2. Estado de infección de la glándula mamaria.	58
4.3. Recuento de células somáticas.	59
4.4. Hallazgos histopatológicos en glándula mamaria infectada con <i>S. aureus</i>.	60
4.5. Análisis de células infiltrantes.	62
4.5.1. <i>Identificación y cuantificación de mastocitos.</i>	62
4.5.2. <i>Identificación y cuantificación de eosinófilos.</i>	64
4.5.3. <i>Identificación y cuantificación de monocitos – macrófagos (CD14).</i>	66
4.6. Análisis morfológico.	68
4.7. Proliferación celular.	69
4.7.1. <i>PCNA</i>	69
4.7.2. <i>Ki-67</i>	71
4.8. Patrón de localización de los factores de crecimiento en glándula mamaria.	73
4.8.1 <i>Inmunomarcación para IGF-I.</i>	73

4.8.2. <i>Inmunomarcación para VEGF</i>	77
4.8.3. <i>Inmunomarcación para TNF-α</i>	80
4.9. Caracterización de la apoptosis.	84
4.9.1. <i>Inmunomarcación para Bax.</i>	84
4.9.2. <i>Inmunomarcación para caspasa-3 activa.</i>	86
4.9.3. <i>Detección de apoptosis in situ</i>	88
5. DISCUSIÓN	91
5.1. Ensayo dosis respuesta.	92
5.2. Efecto del MRB sobre el estado infeccioso de la glándula mamaria.	93
5.3. Efectos del MRB sobre la morfología de glándula mamaria durante la involución.	94
5.4. Efectos del MRB sobre el número de células infiltrantes.	95
5.5. Efectos del MRM sobre la proliferación celular.	98
5.6. Efectos del MRB sobre la expresión de factores de crecimiento en la glándula mamaria.	99
5.6.1. <i>IGF-I</i>	100
5.6.2. <i>VEGF</i>	101
5.6.3. <i>TNF-α</i>	103
5.7. Efecto del MRB sobre los mecanismos de muerte celular.	105
6. CONCLUSIONES	109
7. RESUMEN	112
8. SUMMARY	117
9. BIBLIOGRAFÍA	121

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
aFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos ácido
ALMAST	Asociación argentina de lucha contra mastitis
AMPc	Adenosina-monofosfato-cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico (mensajero)
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CSF	Factor estimulante de colonias
DAB	3.3-diaminobenzidina
FC	Factores de crecimiento
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
GMPc	Guanina-monofosfato-cíclico
HC	Hormona de crecimiento
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IGFBPs	Proteínas ligadoras de IGFs
IGFRs	Receptores de IGFs
IGFs	Sistema de factores de crecimiento análogos a insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IIM	Infección intramamaria
IL	Interleuquina
KDO	2-keto-3-deoxyoctonate
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
LPS	Lipopolisacárido
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MMP	metalo-proteinasas de la matriz
MRB	Modificadores de la respuesta biológica
NK	<i>Natural killer</i>
NPM	Neutrófilos polimorfonucleares
PBS	Buffer fosfato salino
PI	Post inoculación
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
RCS	Recuento de células somáticas
RG	Receptor de glucocorticoides
RT-PCR	Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TGF- α	Factor transformante del crecimiento- α
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1	Esquema de la estructura del sistema secretor de la glándula mamaria bovina.	25
2	Metodología empleada por el kit de detección de apoptosis <i>in situ</i> ApopTag® Plus–Peroxidasa (Chemicon Internacional, Temecula, CA).	50
3	Medias del recuento de células somáticas de cuartos mamarios inoculados con un modificador de la respuesta biológica a base de lipopolisacárido bacteriano al final de la lactancia en vacas Holstein.	57
4	Secciones histológicas de cuartos mamarios crónicamente infectados con <i>S. aureus</i> tratados con MRB a los 7 días del secado. Coloración: hematoxilina-eosina.	61
5	Secciones histológicas de cuartos mamarios crónicamente infectados con <i>S. aureus</i> tratados con placebo a los 14 días del secado.	62
6	Coloración con Azul de Toluidina en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con MRB al día 14 del secado. Las flechas indican mastocitos con gránulos citoplasmáticos intensamente teñidos. (Vn) Vénula.	63
7	Coloración con Azul de Toluidina en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> , tratada con MRB al día 21 del secado. Las flechas indican mastocitos con gránulos citoplasmáticos intensamente teñidos.	64
8	Coloración Rojo Sirius-Alcalina en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con MRB a los 7 días del secado. Las flechas indican eosinófilos teñidos de rojo en el estroma mamario.	65
9	Coloración Rojo Sirius-Alcalina en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> , tratada con placebo a los 14 días del secado. Las flechas indican eosinófilos teñidos de rojo en el interior de los alvéolos mamarios.	65
10	Coloración Rojo Sirius-Alcalina en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> , tratada con MRB a los 7 días del secado. Las flechas indican eosinófilos teñidos de rojo en el interior de los alvéolos y en el estroma mamario.	66
11	Inmunomarcación con anti CD14 en glándula mamaria no infectada tratada con MRB a los 7 días del secado.	67
12	Inmunomarcación con anti CD14 en glándula mamaria infectada con <i>S. aureus</i> tratada con MRB a los 21 días del secado.	68
13	Inmunomarcación para PCNA en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con placebo, a los 7 días de la involución. Las flechas indican células PCNA intensamente positivas (3+).	70
14	Inmunomarcación para PCNA en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> , tratada con placebo a los 7 días del secado. Las flechas indican células PCNA intensamente positivas (3+).	70
15	Inmunomarcación para PCNA en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> , tratada con MRB, a los 21 días del secado. Las flechas indican células PCNA intensamente positivas (3+). (#) Eosinófilos en el interior del alvéolo mamario no reactivos a PCNA.	71
16	Inmunomarcación para Ki-67 en cuartos mamarios infectados con <i>S. aureus</i> tratados con MRB o placebo durante la involución.	72
17	Inmunomarcación para IGF-I en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> tratada con MRB a los 14 días de la involución. Se observa marcación intensa (3+) en el endotelio y fibras musculares lisas en una arteriola. El tejido conectivo interlobulillar no reaccionó a la inmunomarcación.	74
18	Inmunomarcación para IGF-I en glándula mamaria bovina no infectada tratada con placebo	75

	a los 14 días de la involución. A) Reacción intensa a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales alveolares. B) Máscara de la inmunomarcación.	
19	Inmunomarcación para IGF-I en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> tratada con MRB a los 14 días de la involución. A) Reacción intensa a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales alveolares. B) Máscara de la inmunomarcación.	76
20	Inmunomarcación para VEGF en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con MRB, a los 7 días del secado. A) Reacción intensa a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales alveolares. B) Máscara de la inmunomarcación.	78
21	Inmunomarcación para VEGF en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> , tratada con MRB, a los 7 días del secado. A) Reacción intensa a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales alveolares. B) Máscara de la inmunomarcación.	79
22	Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> tratada con MRB a los 14 días del secado. Marcación intensa (3+) del citoplasma de las células epiteliales que tapizan los alvéolos y conductos mamarios. Marcación intensa (3+) del citoplasma de macrófagos (flechas).	81
23	Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con MRB, a los 7 días de la involución. Marcación intensa (3+) de las fibras musculares lisas de la pared de una arteriola.	81
24	Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> tratada con placebo a los 14 días del secado. Marcación intensa (3+) del citoplasma de linfocitos intraepiteliales (flechas).	82
25	Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria no infectada tratada con MRB a los 7 días del secado. Curpos amiloides no reactivos a la inmunomarcación en el interior de los alvéolos (#).	82
26	Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria no infectada, tratada con placebo.	83
27	Inmunomarcación para Bax en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con placebo, a los 14 días del secado.	85
28	Inmunomarcación para Bax en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> , tratada con placebo, a los 7 días del secado.	85
29	Inmunomarcación para Bax en glándula mamaria bovina infectada con <i>S. aureus</i> , tratada con MRB, a los 21 días del secado.	85
30	Inmunomarcación para caspasa-3 activa en glándula mamaria bovina durante la involución.	87
31	Localización de apoptosis en glándula mamaria bovina durante la involución (técnica de TUNEL).	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.		Pág.
1	Citoquinas y productos microbianos evaluados como inmunomoduladores para aumentar la inmunidad en la glándula mamaria bovina.	7
2	Resumen de las defensas celulares de la glándula mamaria.	11
3	Efecto de las citoquinas en la respuesta inflamatoria e inmune en glándula mamaria.	24
4	Células somáticas en leche bovina.	30
5	Anticuerpos primarios y secundarios utilizados, sus diluciones de trabajo, método de recuperación antigénica empleado y procedencia.	49
6	Proporción de cuartos mamarios infectados luego de la infusión intramamaria de un modificador de la respuesta biológica (MRB) o placebo en cuartos infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	59
7	Proporción de cuartos con valores crecientes de recuentos de células somáticas en cuartos infectados con <i>S. aureus</i> tratados con MRB o con placebo.	59
8	Proporción de cuartos con valores crecientes de recuentos de células somáticas en cuartos no infectados tratados con MRB o con placebo.	60
9	Cuantificación de mastocitos en cuartos mamarios infectados con <i>S. aureus</i> y no infectados tratados con modificador de la respuesta biológica (MRB) y placebo durante la involución.	63
10	Cuantificación de eosinófilos en cuartos mamarios infectados con <i>S. aureus</i> y no infectados tratados con modificador de la respuesta biológica (MRB) y placebo durante la involución.	66
11	Cuantificación de monocitos-macrófagos en cuartos mamarios infectados con <i>S. aureus</i> y no infectados tratados con modificador de la respuesta biológica (MRB) y placebo durante la involución.	67
12	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el estroma mamario en cuartos no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	69
13	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre la expresión de PCNA en cuartos mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	69
14	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre la expresión de Ki-67 en cuartos mamarios infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	73
15	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de área inmunomarcada para IGF-I en cuartos mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	77
16	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de área inmunomarcada para VEGF en cuartos mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	80
17	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de área inmunomarcada para TNF- α en cuartos mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	80
18	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de área inmunomarcada para Bax en cuartos mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	84
19	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de células epiteliales inmunomarcadas con caspasa-3 activa en cuartos	86

	mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	
20	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de células estromales inmunomarcadas con caspasa-3 activa en cuartos mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	87
21	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de apoptosis de células epiteliales en cuartos mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	88
22	Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de apoptosis en células estromales en cuartos mamarios no infectados e infectados con <i>S. aureus</i> durante la involución.	89

1. INTRODUCCIÓN



1.1. Consideraciones generales

La mastitis bovina es una enfermedad con alta prevalencia en los sistemas productivos lecheros, especialmente cuando los animales sufren mayor estrés y es reconocida como la enfermedad más costosa del ganado lechero (Kehrli y Harp, 2001). Las pérdidas provienen de la disminución de la producción (Beck *y col.*, 1992; Lescourret y Coulon, 1994), el tratamiento antibiótico, el descarte de la leche o la disminución del precio de la misma, el incremento del tiempo y trabajo de ordeño, el secado prematuro, la pérdida de la condición corporal, el alargamiento del intervalo parto-parto, hasta la muerte de animales (Mol, 2000). En la Argentina los trabajos realizados por ALMAST (Asociación Argentina de Lucha Contra Mastitis), son coincidentes con los realizados en países desarrollados, que estiman que las pérdidas por vaca por año oscilan entre U\$S 90 a 184 (Blosser, 1979, Crist *y col.*, 1997, Jones, 1998).

La incidencia de mastitis aumenta cuando se dañan los mecanismos de defensa de la glándula mamaria. El ganado de los sistemas productivos lecheros se expone a numerosos factores genéticos, fisiológicos y medioambientales que pueden comprometer la inmunidad del hospedador y aumentar la incidencia de mastitis (Hopster *y col.*, 1998, Waller, 2000). En los últimos años, el énfasis en la selección genética para maximizar la producción de leche ha aumentado el estrés metabólico asociado con la síntesis y secreción de leche, existiendo una correlación negativa entre la capacidad de producción de leche y la resistencia a la mastitis (Detilleux *y col.*, 1995).

Al finalizar la lactancia, la involución normal de la glándula mamaria bovina, en lo que se denomina etapa de vaca seca, es de fundamental importancia para asegurar una máxima producción de leche durante la lactancia siguiente (Sorensen y Enevoldsen, 1991). Durante el período no lactante se originan infecciones intramamarias (IIM) que pueden reducir la producción láctea hasta en un 30% comparando con cuartos mamarios no infectados (Sordillo y Nickerson, 1988, Sordillo *y col.*, 1989). Además, las IIM contraídas durante la involución están frecuentemente asociadas con la aparición de mastitis clínicas durante la lactancia temprana y pueden tener un efecto perjudicial en la calidad y producción de leche.

La susceptibilidad de la glándula mamaria bovina a las nuevas IIM aumenta marcadamente durante la involución temprana y durante el periparto (Oliver y Sordillo, 1989). Durante la involución temprana de la glándula mamaria comienzan a aumentar significativamente algunas proteínas defensivas, como la lactoferrina e inmunoglobulinas, así como células del sistema inmune; sin embargo, la aparición de nuevas infecciones

intramamarias se ve favorecida en esta etapa (Oliver y Mitchel, 1983). Esto se debe fundamentalmente al gran volumen de leche acumulado, la falta de remoción de la leche y la escasa concentración de los sistemas defensivos durante los primeros días de este período (Oliver y Sordillo, 1989). Durante el parto, el estrés producido por la preñez y el parto estimula la producción de una variedad de hormonas que tienen importantes efectos sobre la respuesta inmune. Un grupo de estas hormonas de estrés que regulan la función inmune son conocidas como corticoesteroides. La síntesis de glucocorticoides (dexametasona) puede disminuir el número, la distribución y función de los leucocitos en sangre bovina (Waller, 2000). Estos hechos determinan la necesidad de implementar medidas de control durante el período seco a los efectos de disminuir al máximo la presencia de IIM al parto.

Tradicionalmente, el control de las IIM durante el período de vaca seca se realiza con antibióticos de acción prolongada (Bramley y Dodd, 1984). Las terapias actuales para el control de las mastitis cuentan con el uso de antibióticos, principalmente β -lactámicos y macrólidos. Estos compuestos han tenido enorme impacto en los sistemas lecheros con grandes beneficios en la salud de la ubre y producción de leche. Sin embargo, las limitaciones de este método radican en varios factores. (1) La dispar eficacia de las formulaciones antibióticas frente a los distintos organismos patógenos de mastitis. (2) La falta de prevención de nuevas IIM durante el parto, sobre todo en aquellos rodeos en que predominan los organismos patógenos ambientales. Esto se debe a que la concentración de antibiótico declina sustancialmente hacia la fecha de parto, no siendo recomendable administrar una segunda dosis de antibiótico en el parto por la posibilidad de aparición de residuos ilegales de droga en leche. Además, si la vaca tratada para antes de la fecha estimada, es posible que accedan a la leche residuos de antibióticos. (3) El uso indiscriminado de antibióticos promueve la selección de cepas bacterianas resistentes, lo cual puede dificultar la terapia antibiótica en el futuro (Sandholm y Pyörälä, 1995).

Las limitantes de esta práctica han motivado la búsqueda de nuevas alternativas que han sido dirigidas tanto a reforzar la terapia antimicrobiana administrada al inicio del período seco, como a incrementar los factores protectores naturales de la glándula mamaria durante el mismo. Estudios realizados durante el período no lactante determinaron que la glándula completamente involucionada es marcadamente resistente a las IIM (Oliver y Sordillo, 1988; Nickerson, 1989). Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que acelerando la involución mamaria e incrementando los factores defensivos naturales es posible favorecer la prevención de nuevas IIM (Oliver y Smith, 1982a). Dentro de las posibles alternativas para aumentar la resistencia a las infecciones, se ha contemplado la estimulación de la respuesta

inmune inespecífica por medio del uso de modificadores de la respuesta biológica (MRB) o compuestos inmunomoduladores. Estos agentes se han utilizado individualmente para potenciar regímenes de terapia antibiótica o de inmunización específica (vacunas), y pueden convertirse en una alternativa eficaz a los métodos tradicionales de control de las enfermedades (Campos *y col.*, 1993).

Los MRB activan factores protectores de la glándula mamaria que determinan la resistencia a las infecciones. Consecuentemente, al modificar la respuesta inmune inespecífica del hospedador, podrían utilizarse en el inicio del período seco, etapa caracterizada por la caída de las defensas naturales del hospedador (Oliver y Sordillo, 1988), para contribuir a eliminar infecciones presentes y evitar el establecimiento de nuevas infecciones en la glándula.

Muchas citoquinas como interleuquina-2 recombinante bovina (Daley *y col.*, 1990, Nickerson *y col.*, 1993), interferón- γ (IFN- γ) (Quiroga y Nickerson, 1993), factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF) (Nickerson *y col.*, 1989, Kehrlí *y col.*, 1991), otras sustancias como β 1,3-glucan (Inchaisri *y col.*, 2000), inmunomoduladores obtenidos de *Parapox ovis* (Zecconi *y col.*, 1999) y lipopolisacáridos (LPS) bacterianos de *Escherichia coli* (Oliver y Smith, 1982b, Vandeputte-Van Messom *y col.*, 1995) han sido usados como estimulantes de la respuesta inmune en la glándula mamaria bovina.

1.2. Agentes inmunomoduladores

Una de las más prometedoras alternativas a los clásicos tratamientos con antibióticos es el uso de inmunomoduladores para aumentar la respuesta de las defensas del hospedador (Tzianabos, 2000).

Los inmunomoduladores pueden diferenciarse en sustancias que inducen reacciones inmunes (parainmunización) y sustancias que suplantán o reemplazan las reacciones inmunes primitivas (ej, citoquinas) (Zecconi, 2000). El tipo de actividad de estos compuestos depende de su mecanismo de acción, sitio de acción, dosis y tiempo de administración (Tzianabos, 2000). Así, en algunos casos, la finalidad será aumentar la intensidad de la respuesta (estrés, vacunación, infecciones, etc.), mientras que en otros casos se tratará de reducirla (enfermedades autoinmunes, trasplantes, alergias, hipersensibilidad, etc.). Otros sinónimos

incluyen: inmunoestimulantes, inmunopotenciadores, agentes inmunoterapéuticos y MRB. Los inmunomoduladores ejercen sus efectos sobre la respuesta inmune innata o adquirida.

Muchas clases de estos compuestos, como proteínas, lipopolisacáridos, glucoproteínas y derivados de lípidos, han sido caracterizados como moléculas que producen potentes efectos en el sistema inmune del hospedador. Numerosos inmunomoduladores han sido utilizados con la finalidad de aumentar los mecanismos de respuesta inmune no específica contra patógenos causantes de la mastitis bovina (Campos *y col.*, 1993; Zecconi, 2000). Sin embargo, el mecanismo exacto de acción y los efectos de los compuestos empleados en tejido mamario bovino no han sido completamente esclarecidos.

Según Quinn (1990), un inmunomodulador ideal debe poseer una serie de características para su uso en los animales domésticos:

- No debe ser tóxico o pirogénico aún a altas dosis, ni poseer actividad teratogénica, carcinogénica o tener algún efecto adverso a largo plazo.
- Si es administrado con vacunas debe tener un efecto adyuvante e incrementar la respuesta inmune.
- Debe estimular la inmunidad inespecífica frente a patógenos.
- Debe incrementar la respuesta primaria y secundaria a agentes infecciosos.
- El compuesto del producto debe ser inactivo o biodegradado en el medio ambiente y no debe excretarse en leche o huevos.
- Debe ser activo por vía oral y mantener su estabilidad en agua y alimentos.
- Debe ser compatible con otros fármacos incluidos antibióticos y antiparasitarios.

12.1. Mecanismo de acción

El modo de acción de muchos inmunomoduladores no es completamente conocido, aunque generalmente sus principales dianas en el sistema inmune son los linfocitos T y B, monocitos/macrófagos, granulocitos y células *natural killer* (NK). Sin embargo, se han comprobado y propuesto diversas hipótesis que podrían explicar la actuación de algunas de estas sustancias.

Muchas de las formas de acción de los MRB están basadas en la alteración que producen en la actividad de las células inmunes, cambios en la expresión genética, procesamiento del ARNm, transporte intracelular de proteínas, síntesis proteica y la secreción y expresión de proteínas en la superficie celular, lo cual induce cambios celulares que pueden influir en el inicio, consecución y regulación de la respuesta inmune (Quinn, 1990; Pell, 1995). En muchos

casos, se ha observado que la acción de los inmunomoduladores está relacionada con el mecanismo y equilibrio del adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc) y la guanina-monofosfato-cíclico (GMPc) (Kehrly y Thot, 1990; Quinn, 1990). Se ha demostrado que el aumento de los niveles de AMPc inhibe la función efectora de los linfocitos lo que conlleva a una inmunosupresión, mientras que altos niveles de GMPc promueven un incremento en la actividad de los linfocitos maduros lo que se traduce en una inmunoestimulación (Mulcahy y Quinn, 1986; Quinn, 1990).

1.3. Modulación de la inmunidad innata

La modulación de la inmunidad innata generalmente se realiza para elevar la respuesta inmune del animal cuando este se expuso a agentes patógenos y/o está inmunocomprometido. Se han realizado muchos esfuerzos para modular los mecanismos de defensa en la glándula mamaria bovina. Las sustancias utilizadas incluyen citoquinas y productos microbianos como los que se resumen en la Tabla 1.

Como las citoquinas controlan el desarrollo y regulación de la respuesta inmune, numerosos estudios han investigado su utilización como inmunomoduladores. La administración de citoquinas como G-CSF, IFN- γ e interleuquina 2 (IL-2) ha demostrado aumentar la función de los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) y reforzar la resistencia de la glándula mamaria a las infecciones (Nickerson *y col.*, 1989; Kehrlly *y col.*, 1991; Sordillo y Babiuk, 1991a,b). Se ha observado que la IL-2, al ser administrada con antibióticos en infecciones mamarias con *S. aureus*, potencia el efecto terapéutico de los mismos (Daley *y col.*, 1992).

Debido a que el sistema inmune ha evolucionado para ejercer un efecto principalmente contra microorganismos, muchos inmunomoduladores se basan en el uso de agentes microbianos, o sus productos, con el fin de activar la respuesta inmune general o específica. Ciertos componentes como β -1,3-Glucan (Inchaisri *y col.*, 2000) y virus inactivados como *Parapox ovis* (Zecconi *y col.*, 1999) han sido evaluados por sus efectos inmunomodulatorios en la glándula mamaria bovina. Ambos productos han mostrado efectos inmunoestimulantes mejorando la inmunidad mamaria.

Tabla 1: Citoquinas y productos microbianos evaluados como inmunomoduladores para aumentar la inmunidad en la glándula mamaria bovina.

Sustancias	Observación	Referencias
<i>Citoquinas</i>		
G-CSF	Reduce las nuevas IIM por <i>S. aureus</i> , Prevención en <i>K. pneumoniae</i> e IIM por <i>E. Coli</i> .	Nickerson <i>y col.</i> , 1989, Kehrlí <i>y col.</i> , 1991
IFN- γ	Reduce la tasa, duración y severidad de la enfermedad	Sordillo y Babiuk, 1991a Sordillo y Babiuk, 1991b Quiroga y Nickerson, 1993
IL-2	Mejora la eficacia antibiótica	Daley <i>y col.</i> , 1992 Nickerson <i>y col.</i> , 1993
<i>Productos microbianos</i>		
β -1,3-Glucan	Incrementa el número de monocitos/macrófagos, CD14+ y leucocitos CMH tipo II en vacas secas.	Inchaisri <i>y col.</i> , 2000
<i>Parapox ovis</i>	Reduce las IMI por <i>S. aureus</i> al secado.	Zecconi <i>y col.</i> , 1999
LPS de <i>E. coli</i>	Acelera la involución mamaria.	Nickerson <i>y col.</i> , 1992

1.4. Propiedades inmunomoduladoras de LPS

El LPS es un componente que se encuentra en mayor proporción en la pared de bacterias Gram negativas, siendo una de las mayores toxinas que poseen. El LPS induce en el hospedador una serie de alteraciones y manifestaciones clínicas como fiebre, vómito, anorexia, somnolencia, letargo, diarrea, decaimiento general, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, necrosis tisular, degradación de proteína muscular, disminución del rendimiento cardíaco, apoptosis, inducción de mediadores inflamatorios y shock endotóxico (Norimatsu *y col.*, 1995; Klir *y col.*, 1997; Webel *y col.*, 1997). El LPS está compuesto por dos partes, una cadena de oligosacáridos-polisacáridos y el lípido A, los cuales son, estructuralmente, similares en todas las especies de bacterias Gram negativas (Sunwo *y col.*, 1996).

Sin embargo, el LPS es un potente estimulante del sistema inmunitario con diferentes efectos biológicos e inmunoestimulantes. Su efecto inmunológico depende, básicamente, del lípido A, el cual está constituido por una estructura de monosacáridos y disacáridos así como

de ácidos grasos (Alving, 1993). El LPS o lípido A aplicados parenteralmente, dejan rápidamente el torrente sanguíneo y se acumulan en los macrófagos donde se unen a su receptor, CD14. Seguidamente se produce la fosforilación y activación de una determinada proteína quinasa, así como el aumento de los mecanismos de transducción de señales, lo que produce la estimulación de las funciones de los macrófagos y la secreción de citoquinas por parte de éstos (Basta *y col.*, 2001).

En muchos casos el LPS puede inducir una respuesta inmune exacerbada que contribuye a las lesiones que se producen en el ámbito local en el sitio de infección, como por ejemplo sucede en la infección por *Actinobacillus pleuroneumoniae* (Baarsch *y col.*, 1995). Sin embargo, a pesar de esto, existen LPS seguros y detoxificados que se utilizan como estimulantes para el estudio del sistema inmunitario y como inmunomoduladores (Hadden, 1993). En medicina humana se ha utilizado el lípido A como adyuvante para aumentar la respuesta inmune frente a la toxina del cólera, *Herpes simplex*, virus de Epstein Barr, *Plasmodium falciparum* y *Neisseria meningitidis* (Verma *y col.*, 1992; Alving, 1993).

Diversos autores han comprobado los efectos que el LPS produce sobre el sistema inmunitario (Charley, 1986; Marshall y Zielger, 1989; Pang *y col.*, 1994; Norimatsu *y col.*, 1995; Singh *y col.*, 2000):

- Es un activador de neutrófilos, células T y macrófagos, incrementando en estos últimos la actividad citotóxica antitumoral siendo considerado como un potente inmunomodulador.

- Actúa como mitógeno directamente sobre las células B, independiente de células T.

- Es un estimulante policlonal de las células productoras de inmunoglobulina y actúa como un adyuvante específico.

- Estimula la producción y liberación de IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , factor estimulante de colonias-granulocitos macrófagos (GM-CSF) y molécula intracelular de adhesión-1 (ICAM-1), por parte de macrófagos, linfocitos, células NK y fibroblastos duodenales.

- Incrementa la respuesta inmune de las placas de Peyer y el GMPc en los linfocitos.

- Activa la cascada de reacciones de la respuesta de fase aguda.

- Utilizado de manera intrauterina en vacas incrementa el número de leucocitos.

1.5. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria

La glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa que pueden ser separados en dos diferentes categorías: inmunidad innata e inmunidad específica. La inmunidad innata, también conocida como natural o no específica es el sistema de defensa predominante durante el estadio temprano de la infección. La respuesta no específica está presente o se activa rápidamente en el sitio de infección por numerosos estímulos, pero no aumenta con la exposición repetida al mismo antígeno. Si el mecanismo de defensa no específico funciona adecuadamente, muchos patógenos son eliminados rápidamente dentro de un período de tiempo corto y antes que la respuesta inmune específica se active. La eliminación rápida de la bacteria con frecuencia no resulta en cambios en la calidad de la leche o producción. Las defensas no específicas o innatas de la glándula mamaria están mediadas por las barreras físicas del pezón, macrófagos, neutrófilos, células NK y ciertos factores solubles (Sordillo y Streicher, 2002).

Si el patógeno es capaz de evadir el sistema de defensa innato o no es eliminado, el sistema de defensa de la inmunidad adquirida es disparado. La respuesta inmune adquirida reconoce determinantes antigénicos específicos del patógeno. Si el hospedador debe enfrentar al antígeno más de una vez, un estado elevado de reactividad inmune puede ocurrir como consecuencia de la memoria inmunológica. En comparación con la primera exposición al antígeno bacteriano, la respuesta de memoria puede ser mucho más rápida, considerablemente más fuerte, más duradera y con frecuencia más efectiva en remover o eliminar el patógeno. Los protocolos de vacunación se basan en los rasgos únicos de la respuesta inmune específica (Sordillo y Streicher, 2002).

El sistema inmune es capaz de distinguir lo propio de lo no propio y selectivamente reaccionar solo para antígenos extraños a través de proteínas unidas a membrana genéticamente diversas, llamadas complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La respuesta inmune específica solo puede ocurrir si los antígenos se combinan con moléculas del CMH en la superficie de ciertas células, un proceso conocido como presentación de antígenos. El reconocimiento de factores patogénicos para su eliminación posterior está mediado por macrófagos, ciertas poblaciones linfocíticas e inmunoglobulinas o anticuerpos (Monks y *col.*, 2002; Sordillo y Streicher, 2002; Beutler, 2004).

1.5.1. Defensas anatómicas

El canal del pezón es considerado la primera línea de defensa contra la mastitis, ya que ésta es la ruta a través de la cual invaden los patógenos. El pezón contiene un esfínter muscular que mantiene cerrado el canal entre ordeñes e impide la penetración bacteriana. El canal del pezón también está cubierto con queratina que es crucial para mantener la función de barrera del mismo; la remoción de la queratina ha sido correlacionada con alta susceptibilidad a la invasión y colonización bacteriana. La queratina del pezón es un material de aspecto ceroso que deriva del epitelio escamoso estratificado. La acumulación de queratina puede proveer una obstrucción física a las bacterias impidiendo la migración de las mismas dentro de la cisterna de la glándula. La queratina puede obstruir completamente el canal del pezón durante el período de cese de lactancia (Nickerson, 1987). Dentro del revestimiento de queratina varios agentes antimicrobianos han sido identificados (Treece *y col.*, 1966). Ácidos grasos esterificados y no esterificados presentes en la queratina del pezón son bacteriostáticos e incluyen ácido mirístico, ácido palmitoleico y ácido linoleico. Proteínas catiónicas asociadas con el revestimiento de queratina pueden ligar electrostáticamente con patógenos causantes de mastitis, alterar su pared celular y volverlas más susceptibles a la presión osmótica (Treece *y col.*, 1966; Hogan *y col.*, 1987).

En el periparto, ocurre considerable acumulación de fluidos dentro de la glándula mamaria, causando un incremento de la presión intramamaria (Sordillo *y col.*, 1987; Oliver *y Sordillo*, 1988). La misma es especialmente susceptible a la mastitis durante este momento, parcialmente debido a la dilatación del canal del pezón y filtración de las secreciones mamarias.

1.5.2. Defensas celulares

El número total y actividad de los leucocitos en la glándula mamaria juegan un rol vital en la determinación de la severidad y duración de las IIM. Los leucocitos residentes y reclutados en la glándula mamaria incluyen varios tipos: neutrófilos, macrófagos y linfocitos que son capaces de mediar la respuesta inmune innata o adquirida (Tabla 2).

Los neutrófilos son leucocitos no específicos que son activamente reclutados hacia el sitio de infección. Constituyen el principal tipo celular encontrado en tejido mamario y secreción durante el periodo temprano del proceso inflamatorio asociado con infección bacteriana (Paape *y col.*, 2000). Aunque el número de neutrófilos es relativamente bajo en la

glándula mamaria sana ($<10^5$ cél/mL) su número puede constituir un porcentaje mayor al 90% del total de la población leucocitaria durante la mastitis ($>10^6$ cél/mL). Estas células no específicas viajan de la sangre a la glándula mamaria en respuesta a una variedad de mediadores inflamatorios con la finalidad de fagocitar y eliminar al patógeno bacteriano (Persson *y col.*, 1993). Los neutrófilos poseen efectos bactericidas que son mediados a través de la producción de radicales libres de oxígeno e hidroxilo (Heyneman y Burvenich, 1992). En adición, los neutrófilos son fuente de pequeños péptidos antibacterianos, defensinas, que pueden eliminar a una variedad de patógenos causantes de mastitis (Selsted *y col.*, 1993).

Tabla 2: Resumen de las defensas celulares de la glándula mamaria (Sordillo y Streicher, 2002).

Factor	Función Biológica
Neutrófilos	Fagocitosis y muerte intracelular de bacterias, secreción de factores antibacterianos.
Macrófagos	Fagocitosis y muerte intracelular de bacterias, presentación de antígenos en conjunto con CMH.
Células NK	Linfocitos no inmunes que cuando son activados secretan proteínas antibacterianas.
Linfocitos T	
CD4+ (Linfocitos T <i>helper</i>)	Producción de citoquinas inmunoregulatorias seguido de reconocimiento antigénico con moléculas del CMH clase II; células de memoria seguido de reconocimiento antigénico.
CD8+ (Linfocitos T citotóxicos)	Lisis de células alteradas o dañadas del hospedador en conjunto con moléculas del CMH clase I; producción de citoquinas que pueden regular negativamente ciertas funciones leucocitarias.
Linfocitos T $\gamma\delta$	Las funciones biológicas en la glándula mamaria son especulativas.
Linfocitos B	
Células B maduras	Exponen moléculas de anticuerpos unidos a membrana que facilitan la presentación antigénica; células de memoria después de la interacción antigénica.
Células plasmáticas	Se transforman en linfocitos B diferenciados que sintetizan y secretan anticuerpos contra antígenos específicos.

Durante el parto, la función de un número de neutrófilos está disminuida o alterada (Kehrlí y *col.*, 1989; Heyneman y Burvenich, 1992; Cai y *col.*, 1994; Zecconi y *col.* 1994). En este momento el número de neutrófilos inmaduros en sangre bovina se incrementa, mientras que el número de neutrófilos maduros en sangre y secreción mamaria es menor. Alrededor del parto, la población de neutrófilos también exhibe función disminuida en actividades relacionadas con la defensa como fagocitosis, producción de aniones superóxido, migración celular y quimiotaxis (Kehrlí y *col.*, 1989). Esta última actividad puede estar alterada debido a la proporción disminuida de células que expresan el receptor de adhesión CD62L (L-selectina) que es necesario para la penetración a través del endotelio al sitio de infección (Lee y Kherli, 1998). Una depleción de neutrófilos resulta en un dramático incremento de la susceptibilidad a las IIM (Schalm y *col.*, 1976).

El estímulo del amamantamiento u ordeño induce migración directa de nuevos neutrófilos dentro del tejido mamario (Paape y *col.*, 1992). De este modo la glándula mamaria estéril está abastecida con una fuente constante de neutrófilos. Sin embargo, una vez en la luz de los alvéolos, la ingestión de caseína y grasa causa una pérdida de las funciones fagocíticas y bactericidas y lleva a la muerte de los neutrófilos (Paape y Wergin, 1977). El ordeño remueve los neutrófilos comprometidos, los cuales son reemplazados por nuevos neutrófilos lo cual refuerza las defensas contra las infecciones bacterianas. Este fenómeno podría explicar parcialmente la reducida incidencia de mastitis clínicas en vacas ordeñadas cuatro veces por día comparadas con vacas ordeñadas dos veces por día (Hillerton y Walton, 1991).

Paape y *col.* (1996), demostraron que los neutrófilos bovinos poseen la capacidad de unirse a anticuerpos monoclonales anti CD14 y CD18 humanos, indicando que los CD14 y 18 en neutrófilos humanos y bovinos comparten un determinante antigénico común. Estos receptores celulares de superficie en leucocitos han sido identificados como cruciales para el control de las infecciones por bacterias Gram negativas (Anderson y Springer, 1987; Maliszewski y Wright, 1991). El receptor de CD14 es una proteína de 53 kDa que está presente en monocitos y macrófagos humanos y en menor medida en neutrófilos (Landmann y *col.*, 1991). Esta proteína anclada en la membrana facilita el *clearance* de LPS bacterianos previniendo el shock séptico inducido por éste (Lee y *col.*, 2003), además produce una señal de activación en las células epiteliales mamarias para que expresen IL-8 (Wang y *col.*, 2002).

Los macrófagos representan el tipo celular dominante en leche y tejido mamario sano durante la lactancia. En la patogénesis bacteriana, los macrófagos pueden facilitar la respuesta inmune innata o adquirida. De forma similar a los neutrófilos, las funciones no específicas de los macrófagos son fagocitar las bacterias y destruirlas con proteasas y especies reactivas de

oxígeno. La tasa de fagocitosis de estas células puede incrementarse dramáticamente en presencia de anticuerpos opsonizados contra patógenos particulares (Miller *y col.*, 1988; Magnusson, 1999). Sin embargo, el número de macrófagos mamaros tiende a ser bajo durante la inflamación y poseen bajo número de receptores Fc (Niemiłowski *y col.*, 1988). La habilidad de los macrófagos para secretar sustancias que faciliten la migración y actividad bactericida de los neutrófilos se cree que es de gran importancia en las defensas no específicas de la glándula mamaria. Los macrófagos activos disparan la liberación de prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas que pueden aumentar el proceso inflamatorio local (Persson *y col.*, 1993; Van Kampen y Mallard, 1997; Kehrlí *y col.*, 1999). Los macrófagos también juegan un rol en el desarrollo de la respuesta inmune específica a través del procesamiento y presentación de antígenos en asociación con el CMH clase II (Fitzpatrick *y col.*, 1992; Politis *y col.*, 1992).

Una alteración dramática de las capacidades funcionales de los macrófagos ocurre durante el parto y ha sido directamente relacionada con la incidencia de enfermedad. Aunque el número de macrófagos bovinos es alto en la última semana de gestación la capacidad fagocítica de estas células decrece, posiblemente debido a la baja actividad opsonizadora en secreción mamaria. Esta actividad reducida puede estar mediada por una disminución en la IgM, la cual facilita la fagocitosis tanto para los neutrófilos como para los macrófagos (Waller, 2000). Adicionalmente, la expresión de CMH clase II por los macrófagos bovinos durante el parto disminuye, lo cual podría contribuir a una pobre presentación de antígenos y como resultado una débil respuesta inmune específica de los linfocitos de la glándula mamaria (Fitzpatrick *y col.*, 1992; Mallard *y col.*, 1998).

Los linfocitos son capaces de reconocer antígenos a través de receptores específicos de membrana lo cual define las características inmunológicas de especificidad, diversidad, memoria y capacidad de reconocimiento de lo propio y no propio. Los linfocitos se dividen en dos grupos principales: linfocitos T y B. Los linfocitos T pueden ser clasificados como $\alpha\beta$ -T linfocitos, que incluye a los CD4+ (linfocitos T *helper*) y CD8+ (T citotóxicos o T supresores) y células T $\gamma\delta$. En glándula mamaria sana de humanos, porcinos y bovinos predominan los $\alpha\beta$ -T linfocitos y expresan el fenotipo CD8+ fundamentalmente, en contraste con sangre periférica que expresa primariamente el fenotipo CD4+ (Shafer-Weaver *y col.*, 1996; Asai *y col.*, 1998; Wagstrom *y col.*, 2000). Las células linfoideas en leche humana y bovina también muestran un fenotipo de células de memoria (Bertotto *y col.*, 1990; Taylor *y col.*, 1994). Sin embargo, en glándula mamaria de caprinos, los linfocitos CD4+ son el tipo celular predominante durante toda la lactancia (Ismail *y col.*, 1996). Dependiendo del estadio de la

lactancia y de la localización en el tejido, el porcentaje de cada subconjunto de linfocitos puede variar significativamente. Un mayor cambio en el modelo de tráfico se correlaciona con mayor susceptibilidad a las enfermedades (Park *y col.*, 1992; Shafer-Weaver *y col.*, 1996; Van Kampen y Mallard, 1997).

Durante la mastitis, prevalecen los linfocitos CD4⁺ y son activados en respuesta al reconocimiento de los antígenos del CMH clase II y células presentadoras de antígenos, como células B o macrófagos. Estas células funcionan para activar linfocitos y macrófagos por su habilidad de secretar ciertas citoquinas. Dependiendo del repertorio de citoquinas producidas, la respuesta de las células T *helper* puede facilitar tanto la respuesta inmune mediada por células (tipo Th1) o la respuesta inmune humoral (tipo Th2) (Brown *y col.*, 1998).

En ratones, la IL-2 e IFN- γ fueron caracterizadas como las citoquinas que más se producen en la respuesta Th1 y las IL-4, -5 y -10 predominan en la respuesta Th2. Sin embargo, se determinó que IL-10 puede producirse y regular todos los subtipos de células Th. Durante el parto, las células CD4⁺ producen menos IL-2 e IFN- γ y más IL-4 y -10, comparadas con las células CD4⁺ obtenidas durante la lactancia tardía (Shafer-Weaver *y col.*, 1999).

Las células T CD8⁺ tienen tanto funciones citotóxicas como supresoras, por lo tanto pueden eliminar células del hospedador que expresen antígenos extraños (en asociación con el CMH clase I) o pueden controlar la respuesta inmune por supresión de la actividad de estas células durante la infección bacteriana. Ha sido sugerido que las células CD8⁺ citotóxicas pueden actuar como “basureros” removiendo células secretoras viejas o dañadas, lo cual puede incrementar la susceptibilidad de la glándula mamaria a las infecciones (Taylor *y col.*, 1994).

Los linfocitos T supresores pueden controlar o modular la respuesta inmune a las infecciones bacterianas. Evaluación de secreciones lácteas de glándulas mamarias bovinas infectadas con *S. aureus* revelan una sub población de linfocitos CD8⁺ activados que son capaces de alterar o suprimir la respuesta proliferativa de los linfocitos CD4⁺ (Park *y col.*, 1993). Los roles inmunoregulatorios de los linfocitos CD8⁺ también dependen del estadio de la lactancia. Células obtenidas de la mitad de la lactancia en vacas lecheras no exhiben actividades citotóxicas y expresan principalmente IL-4 (Shafer-Weaver y Sordillo, 1997).

Las células T $\gamma\delta$ no han sido bien caracterizadas, pero se sugiere que pueden ser citotóxicas y proveer una línea única de defensa contra las infecciones bacterianas. Los linfocitos T $\gamma\delta$ migran preferentemente en las superficies epiteliales y no circulan extensivamente (Allison y Havran, 1991). La habilidad citotóxica de los linfocitos T $\gamma\delta$

sugiere que ellos son capaces de destruir células epiteliales alteradas, incluso células malignas como líneas de células de carcinomas mamarios (Miescher *y col.*, 1990). Estas células también juegan un rol en enfermedades infecciosas y por consiguiente proveen de una importante línea de defensa contra infecciones bacterianas. La contribución de las variaciones en linfocitos T $\gamma\delta$ en la inmunidad global de la glándula mamaria no está del todo clara, debido a que las funciones biológicas de estas células son aún especulativas.

El rol primario de los linfocitos B es producir anticuerpos en contra de patógenos invasores. A diferencia de los macrófagos y neutrófilos, los linfocitos B utilizan receptores de la superficie celular para reconocer patógenos específicos. En forma similar a los macrófagos y células dendríticas pueden funcionar como células presentadoras de antígenos. Los linfocitos B internalizan, procesan y presentan el antígeno en el contexto del CMH clase II para linfocitos T *helper*. Después de la presentación del antígeno procesado, los linfocitos T secretan IL-2, la cual induce a su vez proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas que producen anticuerpos y células de memoria. A diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B, permanecen bastante constantes durante la lactancia (Shafer-Weaver *y col.*, 1996).

Las células NK son linfocitos grandes y granulares que tienen actividades citotóxicas independientes del CMH, utilizan sus receptores Fc para participar en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Las células NK se unen a células tumorales o infectadas con virus y al degranularse secretan perforinas que destruye la célula blanco por disrupción de la membrana celular. Las células NK también son capaces de matar bacterias Gram negativas y positivas, lo que les confiere importancia en la prevención de las infecciones mamarias (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996).

1.5.3. Defensas solubles

Los factores solubles específicos e innatos representan una importante línea de defensa dentro de la glándula mamaria que puede despertar una respuesta efectiva protectora en contra de la invasión de patógenos. Los primeros efectores solubles de la respuesta inmune específica son los anticuerpos producidos por linfocitos B activados por antígenos. Existen cuatro clases de inmunoglobulinas (Ig) conocidas, que influyen en los mecanismos de defensa antibacterianos en la glándula mamaria: IgG₁, IgG₂, IgA e IgM (Guidry y Miller, 1986). En general las Ig alcanzan su pico de concentración máximo en secreciones mamarias durante la calostrogénesis e inflamación. IgG₁ es el isotipo primario encontrado en secreción mamaria

saludable, pero IgG₂, aumenta sustancialmente durante la inflamación de la glándula mamaria. Algunos isotipos pueden actuar como opsoninas (IgG₁, IgG₂ e IgM) aumentando la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos. Por el contrario, IgA no participa en la opsonización bacteriana, pero tiene funciones en la aglutinación de bacterias invasoras que pueden extenderse y causar infecciones bacterianas en la glándula mamaria. Investigaciones previas demostraron que la concentración de IgG en suero bovino es baja al parto y sugieren que la falta o carencia del isotipo IgG₂ se correlaciona con un incremento en la incidencia de mastitis (Mallard *y col.*, 1998). El perfil de producción de anticuerpos es similar en la cerda, donde hay un reducido número de células productoras de IgA en secreción mamaria al parto (Magnusson, 1999). En humanos, la secreción de IgA se ve significativamente reducida en leche normal de mujeres que finalmente desarrollan mastitis, comparados con mujeres que permanecen libres de mastitis (Fetherston, 1998). Durante el parto, cambios en los niveles y actividad de este isotipo de Ig contribuyen a la inmunosupresión generalizada que lleva al incremento de incidencia de enfermedad.

En adición a los efectos específicos de los anticuerpos, la glándula mamaria posee factores bacteriostáticos no específicos que trabajan en conjunto con las Ig o independientemente. Uno de estos factores es la lactoferrina, una proteína producida por las células epiteliales y leucocitos cuya función es unirse a los iones de hierro libres en leche y previene así el crecimiento de las bacterias que necesitan hierro para su desarrollo (Schanbacher *y col.*, 1993). En rumiantes la lactoferrina y la IgG₁ actúan sinérgicamente para inhibir a *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*; por otra parte, bacterias como *Streptococcus agalactiae* pueden actuar usando lactoferrina como una fuente de hierro. En la glándula mamaria bovina en lactancia, la concentración de lactoferrina es menor a la observada durante la involución e inflamación de la glándula. En adición, los efectos bacteriostáticos de la lactoferrina pueden ser inhibidos por la presencia de citrato, un buffer producido por las células epiteliales que transforma al hierro en una forma rápidamente utilizable por las bacterias (Bishop *y col.*, 1976). En consecuencia, ha sido sugerido que el principal rol de la lactoferrina en las defensas de la glándula mamaria es proteger contra infecciones por coliformes, especialmente durante la involución (Sordillo y Streicher, 2002).

El complemento es un conjunto de proteínas presentes en suero y leche que pueden impactar en la inmunidad innata y adquirida. Las proteínas que componen el sistema de complemento son sintetizadas principalmente por los hepatocitos, y por otras células como monocitos y macrófagos tisulares. Muchas de las actividades biológicas del complemento están mediadas por los receptores de complemento localizados en una variedad de células.

Las funciones efectoras del complemento incluyen, lisis de bacterias, opsonización y atracción de los fagocitos al sitio de la activación del complemento. Por ejemplo, las mastitis causadas por bacterias Gram negativas como *E. coli* son especialmente sensibles a la lisis mediada por complemento. El complemento también funciona con un anticuerpo específico como una opsonina que promoverá la fagocitosis y lisis intracelular por neutrófilos y macrófagos de la glándula mamaria (Riollet y col., 2000). La concentración de complemento en secreciones mamarias ha sido medida por sus actividades hemolíticas y bactericidas (Rainard y Poutrel, 1995; Riollet y col., 2000). La concentración más baja se observa en leche de glándulas mamarias sanas durante la lactancia. En contraste, la mayor concentración de complemento se observa en calostro, leches mastíticas y en secreción mamaria obtenida durante la involución, presumiblemente debido a la trasudación de los componentes del complemento a partir de la sangre (Riollet y col., 2000). Sin embargo, el significado global del sistema de complemento en la defensa de la glándula mamaria no ha sido aún bien definido. La información disponible sugiere un rol predominante como mediador proinflamatorio durante las mastitis por coliformes (Rainard y Poutrel, 1995).

Lisozima es una proteína bactericida que está presente en leche y funciona clivando peptidoglicanos de la pared celular de bacterias Gram positivas, así como de membranas externas de bacterias Gram negativas. En leche porcina y humana, lisozima en combinación con complemento e IgA secretoria exhiben una significativa actividad bactericida para *E. coli in vitro* (Sordillo y col., 1997). Debido a que la leche de rumiantes contiene bajas concentraciones de IgA y considerable menos lisozima que la leche humana, se considera que este sistema provee una pequeña protección para la glándula mamaria bovina.

La enzima lactoperoxidasa, en presencia de tiocianato y peróxido de hidrógeno es bacteriostática para bacterias Gram positivas y negativas. Sin embargo, muchos factores pueden variar la efectividad de este sistema en las células epiteliales de la glándula mamaria. Esta enzima es producida en bajas concentraciones por la glándula mamaria. Los niveles de tiocianato en la glándula mamaria dependen de la composición específica de la dieta en la vaca. El peróxido de hidrógeno en la glándula mamaria es generado por constituyentes enzimáticos de la leche y si están presentes, por *Streptococcus*. El sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrogeno ejerce sus propiedades antibacterianas a través de la producción de hipotiocianato, un metabolito reactivo formado por la oxidación del tiocianato (Sordillo y col., 1997). La enzima mieloperoxidasa producida por neutrófilos cataliza la misma reacción de peroxidación que la lactoperoxidasa y adicionalmente cataliza la oxidación de cloruro, producto a través del cual provee de actividad bactericida al sistema.

Numerosos informes han mostrado las capacidades inmunomodulatorias de las citoquinas, sobre importantes funciones en leucocitos mamarios. El mayor grupo de citoquinas estudiadas incluye: IL, factor estimulante de colonias (CSF), IFN y factor de necrosis tumoral (TNF) (Tabla 3).

Aunque todas las citoquinas tienen propiedades básicas comunes, muchas se designan como IL. Existen dos tipos de IL-1, IL-1 α e IL-1 β , que poseen una homología de un 25% entre sí. La IL-1 es secretada por diferentes tipos celulares (linfocitos T y B, células NK, granulocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso, queratinocitos, células de Langerhans, osteoclastos, astrocitos, células mesangiales, células del timo y córnea), aunque son los monocitos/macrófagos la principal fuente de producción (Fernández Botran *y col.*, 1996).

IL-1 α y 1 β han sido detectadas en células mamarias en leche normal de vaca usando la técnica de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Ito y Kodama, 1996; Okada *y col.*, 1997). IL-1 es crucial en el proceso inflamatorio en glándulas mamarias inoculadas con endotoxinas o con mastitis por coliformes tanto naturales como experimentales y en células epiteliales mamarias bovinas *in vitro* (Okada *y col.*, 1997; Persson Waller *y col.*, 2003; Riollet *y col.*, 2000; Shuster *y col.*, 1996, 1997; Shuster y Kehrlí, 1995).

En la infección por *E. coli* una elevación aguda de los niveles de IL-1 se asocia con el flujo de neutrófilos (Riollet *y col.*, 2000; Shuster *y col.*, 1996, 1997; Shuster y Kehrlí, 1995) y ha sido postulado que esta IL está involucrada indirectamente en la quimioatracción de neutrófilos en las infecciones por esta bacteria (Shuster *y col.*, 1997).

La contribución de IL-1 en la respuesta a la infección mamaria por *S. aureus* es insignificante o pasajera, lo cual indica un rol menor de esta citoquina en este tipo de mastitis (Riollet *y col.*, 2000; 2001).

IL-2 es la mejor caracterizada de todas las citoquinas en bovinos. Originalmente descrita como factor de crecimiento de células T, IL-2 es primariamente producida por linfocitos T con fenotipo Th1 y es responsable por la expansión clonal de la respuesta inmune inicial de linfocitos T y establecimiento de la memoria inmunológica seguida de estimulación mitogénica o antigénica. Esta citoquina también juega un rol en el crecimiento y diferenciación de linfocitos B, aumentando la proliferación de timocitos, activando células NK e induciendo la activación de célula T citotóxicas (Alluwaimi, 2004). Existe evidencia de que la disminución de la producción endógena de IL-2 contribuye a la disminución de las capacidades inmunes, lo que puede llevar al desarrollo de enfermedad. La posibilidad de aumentar las defensas de la glándula mamaria bovina con IL-2 para incrementar la resistencia

a la mastitis ha recibido considerable atención. Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que la IL-2 recombinante bovina (IL-2rb) puede aumentar las capacidades funcionales de las poblaciones de células mononucleares dentro de la glándula mamaria (Daley *y col.*, 1991; Sordillo *y col.*, 1997).

IL-2 bovina ha sido detectada en células de glándulas mamarias normales y mastíticas (Alluwaimi, 2000; Alluwaimi y Cullor, 2002; Sordillo *y col.*, 1991; Taylor *y col.*, 1997), sin embargo el rol exacto de esta citoquina en glándula mamaria bovina no ha sido claramente dilucidado. Alluwaimi y Cullor (2002), detectaron un incremento en los niveles de actividad transcripcional de IL-2 en glándula mamaria bovina en la lactancia tardía, sin embargo el significado de este hallazgo no pudo definirse. Por otra parte, Sordillo *y col.* (1991) notaron una marcada disminución de los niveles de IL-2 durante el parto comparado con el posparto. La disminución de las funciones celulares inmunes y el incremento de riesgo de mastitis en el periparto podrían atribuirse parcialmente a la baja actividad de la IL-2.

Aunque la IL-2 ha sido detectada en mastitis por *S. aureus* y por coliformes, el rol patofisiológico exacto de esta citoquina aun permanece poco claro (Alluwaimi *y col.*, 2003; Riollet *y col.*, 2000; 2001).

La IL-8 es un citoquina bien conocida por sus propiedades quimiotácticas de neutrófilos y es producida por monocitos, macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y cierto número de líneas celulares tumorales (Matsushima y Oppenheim, 1989). El rol biológico de la IL-8 en la atracción de neutrófilos hacia la glándula mamaria infectada fue revelado bloqueando su actividad quimiotáctica con anticuerpos anti IL-8 en leche mastítica (Barber y Yang, 1998). Los niveles transcritos de ARNm para IL-8 han sido estudiados en glándula mamaria bovina sana en la mitad y al final de la lactancia (Alluwaimi *y col.*, 2003) sin observarse variaciones significantes entre los periodos estudiados.

La expresión de ARNm para IL-8 ha sido confirmada en mastitis por *S. aureus* y por coliformes (Alluwaimi *y col.*, 2000; Riollet *y col.*, 2000; Shuster *y col.*, 1997). En mastitis experimentales por *E. Coli*, la IL-8 se eleva rápidamente, detectándose en leche a las 14-16 hs post inoculación (Riollet *y col.*, 2000).

IL-8 y la forma soluble de CD14 (sCD14) juegan roles claves en la modulación de mastitis por *E. coli* o por mastitis inducidas por LPS. El mecanismo podría hipotetizarse sintéticamente como sigue: una diminuta cantidad de sCD14 en leche interactúa con una pequeña concentración de LPS en los estadios tempranos de la mastitis. El complejo sCD14-LPS sensibiliza a las células epiteliales mamarias para regular la producción de IL-8 y otras citoquinas inflamatorias. La elevación de los niveles de IL-8 atrae neutrófilos hacia la

glándula mamaria y el sCD14 intensifica la detoxificación de LPS por su unión a una proteína transportadora (LPB) de alta densidad facilitando su *clearance* (Alluwaimi, 2004).

El CSF constituye un grupo de citoquinas requeridas para la proliferación y diferenciación de una variedad de células madre hematopoyéticas. Estos factores de crecimiento son diferentes glicoproteínas que se unen a las células por un receptor común y son producidos por una variedad de células, incluidas células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y células T. Cada CSF tiene como blanco una línea celular específica que expande o activa esta función. La pronunciada influencia de G-CSF en poblaciones celulares fagocíticas sugiere posibles aplicaciones clínicas en la prevención de enfermedades bacterianas infecciosas como la mastitis (Sordillo y Streicher, 2002).

G-CSF recombinante humano ha sido administrado SC en vacas en dosis que variaron entre 1-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día, resultando en un incremento de neutrófilos en sangre periférica después de los 3-5 días post inyección (Cullor y *col.*, 1990). El tratamiento con G-CSF ha mostrado una disminución al azar y directa de la migración de neutrófilos e incremento de la fagocitosis y actividad bactericida. GM-CSF fue identificado por primera vez por su capacidad de inducir células progenitoras hematopoyéticas diferenciadas en granulocitos y macrófagos. Varios estudios en vacas lecheras han mostrado que GM-CSF no es solamente una importante molécula que induce el crecimiento de estos tipos celulares, también afecta una variedad de funciones de los granulocitos maduros. El tratamiento de sangre periférica bovina y neutrófilos de glándula mamaria con GM-CSF recombinante bovino (rb) incrementó significativamente las capacidades bactericidas y quimiotácticas de estas células. La infusión intramamaria de GM-CSF(rb) con dosis mayores a 5 mg no afectaron significativamente el recuento total de células somáticas, pero incrementaron la habilidad de los neutrófilos residentes para producir superóxido e incrementó el porcentaje de células fagocíticas (Daley y *col.*, 1993). Debido a la temprana y rápida regresión de neutrófilos funcionales competentes de la sangre, es crítico para el control de las nuevas IIM, la mejora de la quimiotaxis y fagocitosis por GM-CSF.

IFN es un grupo de proteínas relacionadas de dos clases principales. El IFN clase I consiste en tres tipos relacionados: IFN- α , IFN- β e IFN- ω . IFN- α e IFN- β son producidos por una gran variedad de células en respuesta a varios inductores que incluyen infecciones virales, productos bacterianos y células tumorales. En bovinos el gen de IFN- ω codifica para proteínas producidas en el desarrollo temprano del embrión y es referido como IFN- τ . La segunda clase de IFN consiste en una proteína simple: IFN- γ , el cual no se relaciona con la

clase I de IFN. IFN- γ es una citoquina derivada de los linfocitos T que con frecuencia se produce en respuesta a estímulos mitogénicos o antigénicos (Alluwaimi, 2004).

Ha sido postulado que las enterotoxinas estafilocócicas estimulan la copiosa síntesis de IFN- γ y de otras citoquinas por parte de las células T CD8+ y CD4+ debido a la actividad de súper antígenos de estas enterotoxinas (Yokomizo *y col.*, 1995). Sin embargo, en estudios realizados por Alluwaimi *y col.* (2003) en mastitis experimentales por *S. aureus*, la actividad transcripcional de IFN- γ no cambia significativamente.

Evidencias sugieren que IFN- γ puede despertar cambios funcionales en células fagocíticas en la glándula mamaria que pueden ser efectivas en el control de la mastitis bovina (Sordillo y Babiuk, 1991b). El tratamiento *in vitro* de neutrófilos de glándula mamaria bovina con IFN- γ revirtió los efectos supresores de las secreciones de glándula mamaria e incrementó de manera significativa las capacidades funcionales de los neutrófilos contra *S. aureus* (Sordillo *y col.*, 1991).

TNF- α ha sido monitoreado y detectado en glándula mamaria bovina normal e infectada (Hoeben *y col.*, 2000; Hisaeda *y col.*, 2001; Riollet *y col.*, 2001; Alluwaimi y Cullor 2002). Numerosos estudios han detectado elevados niveles de TNF- α durante toda la lactancia, involución y en el periparto, excepto en un corto periodo antes del parto cuando este disminuye a niveles indetectables. Elevados niveles de TNF- α podrían estar relacionados con el mantenimiento y regulación de las funciones inmunológicas de las células y factores involucrados en los cambios fisiológicos de la glándula mamaria (Rewinski y Yan 1994; Sordillo *y col.*, 1991; 1997).

En mastitis naturales por coliformes, en infecciones experimentales con *E. coli* e infusiones de LPS en glándula mamaria, TNF- α se incrementó significativamente en leche y suero (Shuster y Kehrlí 1995; Shuster *y col.*, 1995; 1996; Nakajima *y col.*, 1997; Hoeben *y col.*, 2000; Hisaeda *y col.*, 2001; Perkins *y col.*, 2002; Slebodzinski *y col.*, 2002; Persson Waller *y col.*, 2003).

Los síntomas agudos más comúnmente asociados con mastitis coliformes están dados por el crecimiento rápido y sin restricción del microorganismo y el subsiguiente desarrollo de una reacción inflamatoria. Dentro de las citoquinas de fase aguda producidas durante el estadio temprano de la infección TNF- α es el mayor factor que causa shock endotóxico durante la mastitis coliforme sobreaguda. Elevadas concentraciones de TNF- α en suero y leche fueron encontradas en vacas muertas con mastitis aguda por *E. coli* durante el periparto (Sordillo y Babiuk, 1991a). Monocitos aislados de vacas lecheras en el periparto pueden producir mayor

TNF- α después de la estimulación con LPS que monocitos aislados de vacas en la lactancia media o tardía (Sordillo *y col.*, 1995). La habilidad aumentada de poblaciones celulares localizadas de producir este potente mediador proinflamatorio alrededor del parto puede explicar la frecuencia aumentada de mastitis clínicas por coliformes durante este periodo (Sordillo y Streicher, 2002). La habilidad de modificar esta producción durante la mastitis coliforme puede aminorar la morbilidad y mortalidad asociada con la forma aguda de esta enfermedad.

En contraste con la liberación constante y sostenida de TNF- α en mastitis por coliformes, la actividad transcripcional de TNF- α tiene solo un corto episodio de elevación en glándulas mamarias infectadas con *S. aureus* a las 24 hs post inoculación, seguida de una notable declinación a las 32 hs post inoculación. Las enterotoxinas de *S. aureus* estimulan a las células T para liberar TNF- α y/o citoquinas como IL-2 e IFN- γ (Yokomizo *y col.*, 1995). TNF- α podría estar involucrado en la actividad quimiotáctica de neutrófilos, pero la naturaleza inmunosupresiva de la infección por *S. aureus* podría influenciar la síntesis y producción de TNF- α (Alluwaimi *y col.*, 2003).

El receptor de TNF- α es estructuralmente similar al receptor inductor de muerte Fas (también llamado CD95 o Apo 10), por presentar un dominio citoplasmático particular llamado “dominio de muerte”. La unión al ligando resulta en el agrupamiento del receptor y de los dominios de muerte iniciando la cascada de activación de las caspasas, llevando a la célula a la apoptosis (Ashkenazi y Dixit, 1998). El receptor de TNF ha sido demostrado en muchos tejidos incluyendo células mamarias de humanos y ratas (Varela e Ip, 1996). Basolo *y col.*, (1993) demostraron la presencia de proteínas y ARNm para TNF- α en células epiteliales mamarias en humanos. Ip *y col.*, (1992) sugieren un potencial rol de TNF- α en la proliferación del epitelio mamario y morfogénesis durante el ciclo de lactación en la rata.

Varela e Ip (1996) hipotetizaron que la acción bien conocida de inducir la apoptosis del TNF- α que se observó en muchos otros tipos celulares podría estar inhibida en la glándula mamaria por una proteína aun no identificada en los otros estadios del ciclo de la lactancia y estar presente el estadio de la involución. Una relación entre TNF- α y la producción de metalo-proteinasas de la matriz (MMP) fue sugerido (Varela *y col.*, 1997) y ha sido recientemente confirmado en detalle. Estos autores mostraron que la secreción de MMP-9 es estimulada por TNF- α *in vitro* y postularon que este puede jugar un rol en la degradación de la matriz extracelular y subsiguiente control de la invasión del estroma que ocurre en la remodelación mamaria.

El estímulo para la liberación de TNF- α y su origen exacto en la glándula mamaria permanecen desconocidos. Una posibilidad sería que las células intersticiales, como leucocitos, encontrados en la glándula mamaria sirvan como fuente de TNF- α . De hecho, se ha observado que los linfocitos se agregan en la glándula mamaria durante la gestación y lactación (Solari y Kraehenbuhl, 1987) y que la proporción de macrófagos en periparto en la vaca fue alta (Park *y col.*, 1992; Sordillo *y col.*, 1995). Es interesante que, no solo el número de macrófagos mamarios, sino también la capacidad de producción de TNF- α fue significativamente mayor con respecto a los monocitos en sangre (Sordillo *y col.*, 1995).

El estrés producido durante la preñez y el parto estimulan la producción de varias hormonas de estrés que pueden tener importantes efectos en la respuesta inmune. Un grupo de estas hormonas conocidas por regular la función inmune son los corticoesteroides. La dexametasona sintética puede disminuir el número total, distribución y función de los leucocitos en sangre bovina (Hopster *y col.*, 1998). Como se describió previamente, estudios de neutrófilos durante el parto, revelan una regulación negativa de moléculas de adhesión (CD62L y CD18), lo cual se correlaciona con la disfunción de neutrófilos y desarrollo de enfermedad en el ganado (Preisler *y col.*, 2000). Un mecanismo potencial para explicar este efecto podría ser que la dexametasona induce una regulación negativa del receptor de glucocorticoides (RG) sobre neutrófilos alterando la expresión génica de CD62L, llevando a disminuir la migración de neutrófilos durante el periparto (Preisler *y col.*, 2000). Adicionalmente los glucocorticoides causan una disminución en sangre de linfocitos T $\gamma\delta$, baja concentración de IgM en secreción mamaria, reducida expresión de CMH en células mononucleares e inhibición de la producción de citoquinas (Burton y Kehrl, 1996).

En adición a los efectos producidos por la familia de corticoesteroides de las hormonas de estrés, un número de otros factores asociados pueden ser alterados al momento del parto. Por ejemplo cambios en progesterona, 17 β -estradiol, factor de crecimiento análogo a insulina tipo I (IGF-I) y hormona de crecimiento (HC) pueden modificar las funciones de los linfocitos y neutrófilos (Moreira da Silva *y col.*, 1997).

Tabla 3: Efecto de las citoquinas en la respuesta inflamatoria e inmune en glándula mamaria (adaptado de Sordillo y Streicher, 2002).

Citoquina	Observaciones
IL-1	Media la respuesta inflamatoria de fase aguda. Incremento del número de neutrófilos. Aumenta las actividades de fagocitosis y bactericidas de los neutrófilos. Activa la migración de neutrófilos en la glándula mamaria infectada.
IL-2	Aumenta la proliferación de células mononucleares en glándula mamaria. Aumenta las actividades citotóxicas y bactericidas de los linfocitos. Incrementa el número de células plasmáticas. Activa células NK.
IL-8	Induce inflamación. Induce la migración de neutrófilos mediante IL-1. Potente agente quimiotáctico.
G-CSF	Incrementa el número de neutrófilos en sangre y leche. Incrementa el recuento de células somáticas en leche. Incremento de las actividades fagocíticas y bactericidas. Disminuye la migración de neutrófilos.
GM-CSF	Aumenta las actividades quimiotácticas y bactericidas de neutrófilos. Incrementa las actividades citotóxicas. Incrementa el número de células fagocíticas.
M-CSF	Regula la proliferación y diferenciación de macrófagos. Potente agente quimiotáctico de macrófagos.
IFN- γ	Aumenta las actividades fagocíticas y bactericidas de neutrófilos. Efectos supresores inversos sobre las secreciones mamarias.
TNF- α	Aumenta la respuesta inflamatoria de fase aguda. Aumenta las actividades fagocíticas y bactericidas de neutrófilos. Aumenta la expresión de moléculas de adhesión endoteliales.

1.6. Involución de la glándula mamaria

La glándula mamaria está formada por una red lóbulo-ductal de células parenquimatosas (epiteliales, mioepiteliales y células progenitoras) y un estroma de tejido conectivo fibroso y elástico. Este tejido conectivo consta de adipocitos y células similares a fibroblastos, con vasos sanguíneos y linfáticos ramificados a través del estroma (Matitashvili *y col.*, 1997). El conjunto de alvéolos conforman un lobulillo y los lobulillos dentro del tejido conectivo forman lóbulos. La leche secretada por las células epiteliales secretoras del alvéolo (lactocitos) es drenada a través de los espacios alveolares, conductos intralobulillares, conductos colectores centrales, conductos lactíferos, senos lactíferos, canal del pezón y finalmente a través del orificio del pezón hacia el exterior (Figura 1).

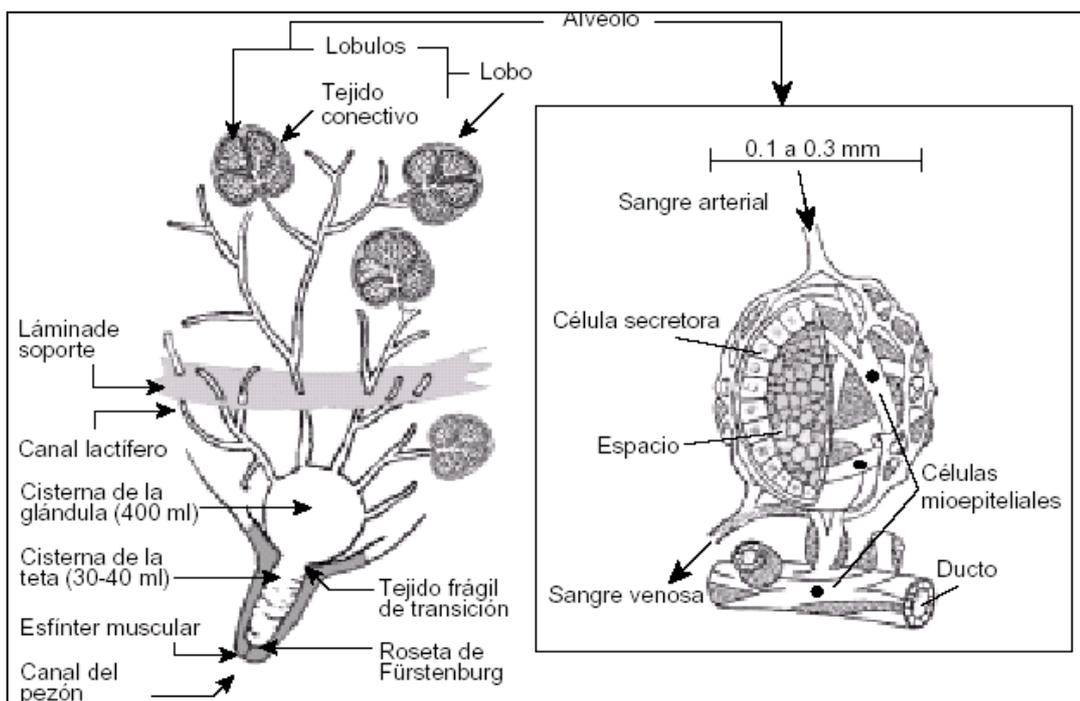


Figura 1: Esquema de la estructura del sistema secretor de la glándula mamaria bovina.

La superficie mucosa del canal del pezón está tapizada por un epitelio escamoso estratificado que cambia abruptamente a un epitelio cúbico estratificado o epitelio cilíndrico biestratificado en la unión de la cisterna del pezón y la cisterna de la glándula, y en los conductos lactíferos, conductos intralobulillares e interlobulillares a un epitelio simple cúbico o cilíndrico (Matitashvili *y col.*, 1997). La pared de los alvéolos, los conductos

intralobulillares e interlobulillares y la cisterna de la glándula contienen células contráctiles o células mioepiteliales. Estas células están ausentes en la cisterna del pezón. El epitelio glandular mamario sufre cambios dinámicos aparentemente asociados con la secreción de leche y con varias proteínas y sustancias no proteicas. La actividad secretoria puede diferir entre una célula y otra en el mismo lobulillo debido a su estado de diferenciación funcional. Estas variaciones morfológicas han sido reportadas *in vitro* e *in vivo* (Gudding y col., 1984; Hensen y col., 2000).

El proceso por el cual la glándula mamaria funcional regresa a un estado quiescente es conocido como involución mamaria. La misma es promovida por el cese del ordeño o destete de las crías. A pesar de que el uso de modelos en roedores ha incrementado el entendimiento de la iniciación de la muerte celular programada que sigue al éstasis de la leche, investigaciones sobre la involución de la glándula mamaria en otras especies han provisto información que resalta similitudes y diferencias entre especies (Monks y col., 2002).

El periodo no lactante previo al parto en ganado lechero se refiere comúnmente como al periodo de secado. En vacas ha sido bien documentado que la duración del intervalo de no lactación es importante para determinar la producción de leche en la lactancia siguiente (Sorensen y Enevoldsen, 1991). Sin un periodo de secado, la producción de leche puede reducirse en un 20%, y para que la producción sea óptima se requiere un periodo de secado de 40-60 días (Coppock y col., 1974; Sorensen y Enevoldsen, 1991). También en la rata se observó que un periodo de secado entre sucesivas lactancias es necesario para una óptima lactancia (Paape y Tucker, 1969).

1.6.1. Morfología de la glándula mamaria involucionada

Los cambios morfológicos que ocurren durante el periodo no lactante en ganado lechero son menos pronunciados que aquellos que ocurren durante la involución mamaria en ratas o ratones no preñados. Estos cambios en animales de lechería reflejan más estrechamente modificaciones en el estado secretor de la glándula mamaria más que un rasgo característico de la regresión del tejido. Esto es particularmente evidente durante el periodo de secado en vacas lecheras. El rasgo morfológico más notorio es el mantenimiento de la estructura alveolar a través de los 60 días preparto luego de que el ordeño ha sido interrumpido (Hurley, 1989).

Investigadores como Holst *y col.* (1987) y Sordillo y Nickerson, (1988) caracterizaron la secuencia de cambios citológicos en tejido mamario bovino durante las semanas siguientes al cese del ordeño. Dentro de las 24 hs del último ordeño, se observó una reducción en la fusión de vesículas secretorias con la membrana apical de la célula epitelial mamaria con la consecuente acumulación de vesículas secretorias y gotas de lípidos dentro de la célula alveolar. La fusión de vesículas lleva a la formación de grandes vacuolas que son aparentes con el microscopio de luz dentro de los 2 ó 3 días del secado. La acumulación de productos secretorios y formación de vacuolas coinciden con la inhibición de la síntesis y secreción de leche (Hurley, 1989). Durante las 48 hs iniciales, muchas células exhiben una disminución en las organelas citoplasmáticas involucradas en la síntesis de leche; como retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi. Por dos semanas, muchas células exhiben una reducción marcada en su capacidad secretoria aparente. Sin embargo, las células permanecen viables y retienen suficiente cantidad de organelas sintéticas y metabólicas que permiten la secreción y síntesis de algunos componentes como la lactoferrina durante el periodo de secado (Goodman y Schanbacher, 1991). Alrededor de los 30 días del cese del ordeño, cuando el lumen alveolar muestra un tamaño mínimo, las células epiteliales exhiben pocas vacuolas. Durante las dos semanas antes del parto la proporción de células totalmente activas se incrementa y a los 7 días preparto casi todas las células alveolares muestran características de células preparadas para la síntesis y secreción de leche. El citoplasma aumenta de tamaño y se acumulan gotas lipídicas y vesículas secretorias en el polo basal y apical de la célula (Sordillo y Nickerson, 1988).

La glándula mamaria bovina no involuciona con el grado observado en otras especies (Lascelles y Lee, 1978). Durante la involución mamaria en rata y ratón, las células epiteliales sufren apoptosis y muchas de ellas son volcadas dentro del lumen alveolar (Strange *y col.*, 1992; Li *y col.*, 1996), conduciendo al colapso y destrucción del alvéolo dentro de las 2 semanas (Walker *y col.*, 1989). En vacas lecheras no se observó ningún desprendimiento de células epiteliales dentro del lumen alveolar ni separación de la membrana basal durante el periodo de secado, lo que sugiere que la pérdida neta de células durante este periodo es pequeña (Capuco *y col.*, 1997). Aunque la población de células epiteliales mamarias bovinas padece apoptosis luego del inicio del éstasis de leche (Wilde *y col.*, 1997) no se observó una regresión significativa del tejido durante el periodo no lactante antes del parto (Capuco *y col.*, 1997). Muchas de estas diferencias entre especies están dadas o son atribuibles a los efectos de la preñez sobre la involución. Capuco *y col.* (2002) demostraron que la preñez inhibe la

involución de la glándula mamaria en ratón después del destete forzado por un mecanismo que involucra la combinación de la estimulación de la proliferación celular y la inhibición por apoptosis. En contraste, la preñez parece promover la apoptosis y gradual involución en la glándula mamaria murina lactante (Quarrie *y col.*, 1996).

Es importante comprender que los eventos que ocurren durante el periodo de secado difieren significativamente de la involución mamaria frecuentemente estudiada en modelos en roedores. En ausencia de una preñez concomitante, la involución mamaria es rápida y extensiva. En contraste, los efectos mamogénicos de la gestación mejoran el proceso de involución y promueven la producción de células mamarias. Cuando el ratón está preñado, el tiempo del destete y la apoptosis mamaria se reducen; mientras que la proliferación celular se intensifica con respecto a su contraparte no preñada (Capuco *y col.*, 2002). Consecuentemente, Capuco *y col.* (2003) proponen el término “*involución regenerativa*” para describir más completamente el proceso de renovación celular y remodelación del tejido que ocurre durante la involución con preñez concurrente.

Smith y Chepko (2001) hipotetizan que la glándula mamaria murina contiene una población de células madre capaces de generar todas las células diferenciadas en la glándula mamaria, así como células progenitoras con una limitada diferenciación con habilidad de generar células alveolares o ductales (Kordon y Smith, 1998; Smith, 1996). Las células progenitoras ductales y lóbulo-alveolares tienen limitado potencial de replicación (Chepko y Smith, 1999) y pueden ser renovadas por la población de células madre. Durante la involución mamaria las células progenitoras parecen sufrir apoptosis (Chepko y Smith, 1997), por esto es razonable especular que ellas puedan ser renovadas durante el periodo no lactante para maximizar la producción de leche en la próxima lactancia. Si existen células progenitoras similares en tejido mamario bovino, se hipotetiza que el periodo de secado es importante para promover el reemplazo de las poblaciones celulares.

Mientras muchos investigadores notaron que las células epiteliales mamarias son capaces de fagocitar (Richards y Benson, 1971; Walker *y col.*, 1989), la idea de que la población de macrófagos intraepiteliales y células apoptóticas aumenta durante la involución mamaria persiste en la literatura, (Helminen y Ericsson, 1971; Walker *y col.*, 1989). La caracterización de estas células como macrófagos parece haber sido basada exclusivamente en la ultraestructura: citoplasma menos denso y vacuolas fagocíticas. Estudios iniciales en los cuales se infundieron colorantes vitales localizaron a los macrófagos en el estroma de tejido conjuntivo de la glándula mamaria en involución (Mayberry, 1964, Richards y Benson, 1971).

Tatarczuch *y col.*, (1997) realizaron la inmunomarcación de macrófagos en glándula mamaria de oveja, sugiriendo que los mismos están presentes en grandes números en el lumen alveolar 15 días después del destete forzado. Otros tipos celulares se identificaron en el tejido conjuntivo de la glándula mamaria involucionada, incluyendo mastocitos, células plasmáticas y eosinófilos (Gouon-Evans *y col.*, 2000; Masso-Welch *y col.*, 2000). Una conclusión de estos estudios es que existe considerable variación en las células encontradas en las diferentes especies evaluadas.

1.6.2. Citología de la secreción láctea durante la involución

Las células que están presentes en la leche son definidas globalmente como células somáticas. Su concentración (recuento de células somáticas, RCS) y distribución de los tipos celulares han sido estudiadas en las secreciones durante la involución en numerosas especies, incluyendo, cerda, cobayo, oveja y vaca (Nordin y Lee, 1982; Lee *y col.*, 1983; Tatarczuch *y col.*, 2000). En todas estas especies, los LPMN aumentan abruptamente después del destete y predominantemente durante la involución temprana. A medida que avanza la involución los macrófagos comienzan a ser el tipo celular dominante. Ambos tipos celulares, neutrófilos y macrófagos han sido descritos conteniendo vacuolas fagocíticas con micelas caseínicas, gotas lipídicas, restos celulares, sugiriendo que estas células jugarían un rol en el *clearance* de restos de leche y/o fragmentos de células muertas (Lee *y col.*, 1983; Tatarczuch *y col.*, 2000). Presentes en menor número están las células epiteliales viables, células epiteliales descamadas (aparentemente desprendidas del seno de la glándula), eosinófilos y linfocitos T y B. A medida que la cantidad de leche secretada disminuye, la cantidad de células somáticas por mililitro de leche aumenta; sin embargo el número promedio de células hematopoyéticas en el lumen no cambia (Nickerson, 1989).

Aunque el perfil de infiltración es característico de la respuesta inmune innata de mucosas, Paape *y col.* (2000), reportaron que los LPMN constantemente migran dentro de la glándula mamaria bovina estéril y el número de LPMN infiltrantes se incrementa con una infección bacteriana activa. Esta constante migración de LPMN dentro de la glándula mamaria ha sido también descrita en cabras (Manlongat *y col.*, 1998) pero no en roedores y humanos.

Las células somáticas de la leche son consideradas generalmente como un importante parámetro para la detección de mastitis, debido a que la inflamación de la glándula mamaria

resulta en un aflujo de células somáticas, predominantemente LPMN, desde la sangre hacia la misma (Burvenich *y col.*, 1994). La importancia del rol de los LPMN en la patogenia de la mastitis ha sido bien caracterizada, no así la contribución de las células residentes de la leche en los mecanismos de defensa intramamarios. En vacas sanas, el número, recuento diferencial y función de los leucocitos dentro de la glándula mamaria pueden contribuir a la defensa contra patógenos invasores (Dosogne *y col.*, 2003). Se ha demostrado que tanto en infecciones naturales (Vandeputte-Van Messom *y col.*, 1993; Shuster *y col.*, 1996) como en inducidas artificialmente (Nickerson *y col.*, 1990) el incremento del número de células somáticas ejerce un efecto de protección contra la severidad de la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria (Tabla 4).

Tabla 4: Células somáticas en leche bovina.

Tipo de célula	Leche normal (%)	Mastitis subclínica (%)
Neutrófilos	0 – 11	> 90
Macrófagos	66 - 88	2 – 10
Linfocitos	10 - 27	
Células epiteliales	0 - 7	0 – 7

Adaptado de Lee *y col.*, 1980.

1.6.3. Apoptosis e involución mamaria

La apoptosis es una forma de muerte celular ATP dependiente, caracterizada morfológicamente por condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y disminución del tamaño de la célula (Granville *y col.*, 1998; Reed, 2000). El resultado final de la apoptosis es la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos limitados por membrana que son rápidamente removidos por células fagocíticas (Cox *y col.*, 1995; Sladek y Rysanek, 2000). Bioquímicamente la apoptosis se caracteriza por activación de las caspasas, proteasas altamente específicas que clivan sustratos intracelulares (Thornberry y Lazebnik, 1998). La activación de la ola de caspasas inicia una cascada proteolítica que lleva a la fragmentación del DNA y al clivaje de proteínas reguladoras claves que llevan a la muerte celular. En contraste con la apoptosis, la muerte por necrosis es un proceso independiente de energía que se caracteriza por el aumento de tamaño de la célula (Granville *y col.*, 1998; Reed, 2000). A diferencia de la apoptosis, las células necróticas liberan constituyentes celulares que estimulan una reacción inflamatoria en el tejido vecino viable.

El cese abrupto de la lactancia en roedores por remoción de las crías elimina la liberación de hormonas galactopoyéticas que son estimuladas por el amamantamiento y éstasis de leche en la glándula mamaria. El resultado es una rápida declinación en la síntesis de leche y cese de la secreción, regulación negativa de la expresión de genes de diferenciación y remoción de una proporción de células de la glándula mamaria por apoptosis. Dentro de las 24 hs de la remoción de la cría de rata lactante, la abundancia del ARNm para α -, β - y γ -caseína disminuye un 95 % en tejido glandular mamario, y la enzima lipogénica acetil-CoA carboxilasa un 98 % (Travers *y col.*, 1996). La declinación en la actividad sintética está acompañada por pérdida de células epiteliales lumbales.

La fragmentación del DNA genómico en múltiples fragmentos oligonucleosomales de 180-200 pb es la característica principal de las células que padecen apoptosis (Wyllie *y col.*, 1980; Arends *y col.*, 1990). De esta manera, la apoptosis es detectada de rutina como fragmentos escalonados de ADN (*laddering*) por electroforesis en gel de agarosa. Un incremento en *laddering* de ADN fue detectado en glándula mamaria de ratón dentro de las 24 hs de la remoción de la cría y el ADN fragmentado en secciones de tejido por la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end labeling*) identificó células apoptóticas en el epitelio alveolar y espacios lumbales 24 hs después (Quarrie *y col.*, 1995). Cuatro días después del destete la estructura alveolar en tejido mamario de ratón estaba extensamente degenerada y el *laddering* de ADN fue máximo. Después de 6 días el contenido de ADN indicó que 64% de la población celular había sido removida (Quarrie *y col.*, 1996). La respuesta a la involución inducida en tejido mamario rumiante es más lenta que en roedores. Tres días después del cese del ordeño la abundancia de ARNm para caseína y α -lactoalbúmina en tejido mamario bovino se redujo, pero en un grado menor que en roedores y el ARNm para β -lactoglobulina permaneció inalterado (Goodman *y Schanbacher*, 1991). Después de 7 días el ARNm para α_{s1} -caseína y α -lactoalbúmina disminuyeron 85 % y 99 %, respectivamente (Wilde *y col.*, 1998).

Las células apoptóticas han sido caracterizadas en leche durante la lactancia normal y pueden representar un mecanismo normal para reducir la cantidad de células secretoras durante la involución natural (ej. involución gradual). Las células apoptóticas son volcadas dentro de los alvéolos mamaros por un mecanismo que no compromete la integridad del epitelio. Este mecanismo probablemente sea similar al descrito por Roseblatt *y col.* (2001) en células epiteliales de embriones de pollo y células MDCK. Señales desconocidas provenientes de las células muertas hacia sus vecinas hacen que sean empujadas fuera de la

monocapa de células por un mecanismo dependiente de actina y miosina que mantiene las uniones estrechas. Esta expulsión ocurre antes de los cambios característicos de la apoptosis, como activación de procaspasas, condensación de la cromatina, reducción del tamaño celular, unión de la anexina V a la fosfatidilserina expuesta en la superficie. En la glándula mamaria si estas células no son removidas con la subsiguiente remoción de leche, ellas envejecen dentro del lumen durante la involución temprana y pueden observarse al microscopio óptico (Roseblatt *y col.*, 2001).

La integridad alveolar en tejido mamario bovino permanece generalmente intacta cuando el ordeño o amamantamiento es discontinuado (Akers *y col.*, 1990), con solo áreas aisladas de degeneración de tejido incluso varias semanas después del secado. Estas observaciones llevan a sugerir que la remodelación de tejido mamario bovino entre lactancias tiene lugar con solo una modesta pérdida de células epiteliales secretorias (Hurley, 1989).

Las actividades apoptóticas en el tejido mamario ovino (Tatarczuck *y col.*, 1997) se inician con un tiempo y curso similar que en roedores (Strange *y col.*, 1992) comenzando alrededor de los 2 días posteriores al destete con un pico al día 4. El tiempo del curso de la apoptosis luego del éstasis de leche está escasamente documentado en vaca y cabra, sin embargo 7 días después del cese del ordeño, se observó aproximadamente un 4 % de células apoptosis en tejido mamario bovino (Wilde *y col.*, 1997).

La involución de la glándula mamaria en roedores lactantes involucra la remoción de la membrana basal. Este proceso comienza en el segundo día del destete, es máximo al día 4 coincidiendo con el máximo índice de apoptosis (Strange *y col.*, 1992; Quarrie *y col.*, 1996) y es estimulado por cambios recíprocos en la expresión de metaloproteinasas de la matriz y sus inhibidores (Lund *y col.*, 1996). Siete días después del cese del ordeño, la inmunomarcación de colágeno tipo IV y laminina en tejido mamario de cabra mostró alvéolos involucionados rodeados por una membrana basal intacta (Li *y col.*, 1999) y, en forma similar, muchos alvéolos mamaros bovinos permanecieron intactos (Wilde *y col.*, 1997).

1.6.4. Control de la involución mamaria

Los factores que influyen la tasa de involución de la glándula mamaria incluyen hormonas y factores reguladores sistémicos y locales, estado de preñez y estadio de la lactancia. La involución en ratón ha sido caracterizada como dos estadios (Walker *y col.*, 1989; Lund *y col.*, 1996). Durante el primer estadio, la involución mamaria es activada por estímulos locales que inician la apoptosis, pero el proceso puede ser revertido para reiniciar la

producción de leche (Walker *y col.*, 1989). El segundo estadio de la involución es irreversible y está caracterizado por activación de proteasas que destruyen la estructura lóbulo-alveolar de la glándula por degradación de la matriz extracelular y membrana basal, con masiva pérdida de células alveolares. El segundo estadio de la involución puede ser inhibido por glucocorticoides sistémicos y progesterona (Goodman y Schanbacher, 1991; Lund *y col.*, 1996) o por la preñez (Capuco *y col.*, 2003).

La involución mamaria e iniciación de apoptosis por cese de la remoción de leche está dada en parte por la disminución de hormonas galactopoyéticas circulantes. El tratamiento con prolactina luego de la remoción de la cría retrasa la apoptosis en glándula mamaria de ratón (Sheffield y Kotolski, 1992), sin embargo, implantes de hormonas en tejido mamario involucionado fallaron en reproducir el efecto de supervivencia de las hormonas sistémicas (Feng *y col.*, 1995). La depleción de prolactina con bromocriptina durante la lactancia también induce rápidamente la fragmentación del ADN nuclear y la pérdida de células, incluso en ausencia de éstasis de leche (Travers *y col.*, 1996). La prolactina puede inhibir la apoptosis mamaria por represión de IGFBP-5 (Tonner *y col.*, 1997), el cual por otra parte, antagoniza el efecto de IGF-I, un factor de supervivencia importante para las células (Hadsell *y col.*, 1996; Neuenschwander *y col.*, 1996).

La inducción de apoptosis mamaria por anti HC en suero en ratas lactantes (Travers *y col.*, 1996) sugiere que esta hormona es un mediador sistémico del efecto de la remoción de la cría en la involución del tejido; aunque tradicionalmente HC es menos importante en roedores. Aunque HC incrementa la concentración de IGF-I en suero, el efecto anti apoptótico de HC no parece estar mediado por IGF-I. Estos estudios ofrecen un posible mecanismo que explica los efectos interactivos de HC y prolactina, por medio del cual la prolactina optimiza la acción de IGF-I por reprimir la expresión del inhibidor de su acción, IGFBP-5 (Tonner *y col.*, 1997).

Una disminución de los glucocorticoides circulantes luego del destete puede también contribuir a la inducción de apoptosis en la glándula mamaria (Feng *y col.*, 1995). Es de notar que toda la información proviene de estudios en roedores y que casi no existe información comparable sobre el control endocrino en la involución mamaria en rumiantes.

El control sistémico de la involución mamaria inducida está aumentado por mecanismos locales dentro de la glándula que responden al éstasis de leche. La inducción local de la involución del tejido puede surgir por acumulación de factores apoptóticos en leche o por presencia física de leche acumulada. La acumulación de IGFBP-5 en leche después de la remoción de la cría (Tonner *y col.*, 1997) parece ofrecer una oportunidad para un control de

feedback químico sobre número de células mamarias. Los efectos de la distensión física en la supervivencia epitelial mamaria no están bien definidos, sin embargo es claro que la forma celular es un importante determinante de la actividad secretoria (Lee y col., 1984). Se encontró en cultivos que la perturbación de la forma celular rompe los componentes membranosos (Pitelka y Taggart, 1983) modificando la concentración de calcio libre intracelular (Enomoto y col., 1992, 1994) y deprime la expresión génica (Huguet y col., 1995) con probables consecuencias para las funciones epiteliales.

Los genes de la familia bcl-2 codifican para proteínas que regulan la apoptosis (Schorr y col., 1999) y poseen actividades apoptóticas o antiapoptóticas (promoviendo la supervivencia). Los miembros primarios de la familia que promueven la supervivencia de las células son bcl-2, bcl-x_L, bfl-1, bcl-w; mientras que los factores que promueven la apoptosis incluyen, bax, bcl-x_s, bak, bad y bid. La integración de señales de muerte o supervivencia determinan el destino de un tejido o célula. El éstasis mamario determina la expresión de proteínas de supervivencia y muerte dentro de la glándula mamaria. La presencia de proteínas de supervivencia durante la involución temprana de la glándula mamaria puede ser importante para mantener la integridad de los alvéolos y la reversibilidad de la involución durante las primeras 24-48 hs. Sin embargo la prevalencia de expresión de proteínas proapoptóticas probablemente empuja al tejido a la involución irreversible. En tejido mamario, las proteínas bax y bcl-x_s han sido implicadas en la promoción de la involución en este tejido (Capuco y col., 2002).

1.6.5. Influencia del sistema de Factores de Crecimiento Análogos a Insulina (IGFs) en la regulación de la involución mamaria:

El sistema de IGFs, sus receptores (IGFRs) y proteínas ligadoras (IGFBPs) cumplen funciones muy importantes en la regulación del desarrollo normal de la glándula mamaria y en procesos patológicos. IGF-I es un factor mitogénico y su habilidad para inducir proliferación celular en glándula mamaria ha sido demostrada en numerosos modelos *in vivo* e *in vitro* (Baumrucker y Erondy, 2000; Hadsell y col., 2002).

La expresión específica de IGF-I en glándula mamaria en ratas transgénicas demostró que IGF-I promueve la supervivencia de la célula (inhibe la apoptosis) retrasando la involución de la glándula mamaria (Hadsell y col., 1996).

1.6.5.1. Generalidades:

El sistema de IGF está compuesto por diferentes elementos:

- a) Dos ligandos: IGF-I e IGF-II.
- b) Dos receptores: El receptor tipo 1 (IGFR-1) media la mayoría de las acciones semejantes a las somatomedinas, tanto del IGF-I como del IGF-II. Es un tetrámero relacionado estructural y funcionalmente con el receptor de insulina. La afinidad de este receptor por el IGF-I es ligeramente mayor que por el IGF-II y mucho mayor que por la insulina. El receptor tipo 2 (IGFR-2), liga IGF-II y moléculas que poseen un residuo manosa-6-fosfato (como enzimas lisosomales o el factor transformante del crecimiento β -1 (TGF β -1). Este receptor no se une a insulina y tiene una baja afinidad por el IGF-I mediando, sin embargo, varias acciones de este último. Una función importante del receptor tipo II es mediar el movimiento de enzimas lisosomales. Este receptor participa también en la degradación del IGF-II luego de la internalización, y se lo ha relacionado con la medición de actividades “no clásicas” del IGF-II como la motilidad celular y la mitogénesis (Jones y Clemmons, 1995).
- c) Seis IGFBPs que ligan IGF-I e IGF-II con alta afinidad (Rajaram *y col.*, 1997). Las IGFBPs están presentes en todos los fluidos biológicos y pueden ser clasificadas en 2 grupos:

IGFBP-1, -2, -4, -5 y -6, que están presentes en el suero y otros fluidos biológicos y son llamadas “complejos pequeños”. Poseen un peso molecular aparente que varía entre 24 y 35 kDa, por lo que también se las denomina IGFBPs de bajo peso molecular.

IGFBP-3 es la predominante en suero, donde se la encuentra principalmente en una forma de 150 kDa (“complejo grande”), compuesta de IGF-I o IGF-II, y una subunidad de 85 kDa.

Las IGFBPs incrementan la vida media de los IGFs y mantienen niveles estables de IGFs en varios compartimientos del organismo. Además pueden inhibir o potenciar la acción de los IGFs a nivel de las células blanco o modular su acción por secuestro, ya que poseen una afinidad semejante a la de receptor tipo 1 (Jones y Clemmons, 1995; Rajaram *y col.*, 1997). Otro aspecto importante es que la afinidad de las IGFBPs por los IGFs puede ser reducida por unión de las IGFBPs a proteínas de la matriz extracelular (IGFBP-5) o por proteólisis (IGFBP-3, -5 y -4) (Liu *y col.*, 1993).

16.5.2. Participación en la regulación de la involución mamaria

La involución de la glándula mamaria es una etapa fundamental del ciclo reproductivo en vacas lecheras y constituye un proceso de remodelación o transformación de la glándula para la lactancia siguiente. Está caracterizado principalmente por dos etapas: pérdida de células

epiteliales mamarias (en bovinos es más moderada que en roedores donde es muy intensa) y degradación proteolítica de la matriz extracelular (Quarrie *y col.*, 1996, Wilde *y col.*, 1997). Durante esta transformación, la muerte de las células ocurre por apoptosis (Jaggi *y col.*, 1996).

Aunque los eventos intracelulares que determinan el inicio de la apoptosis en células epiteliales mamarias están actualmente bien dilucidados, el control hormonal y la regulación del proceso que resulta en la inmediata modificación del equilibrio entre la supervivencia celular o la activación de la muerte por apoptosis aún no está definido (Accorsi *y col.*, 2002). Por lo tanto, el conocimiento del rol y acción de los numerosos factores que controlan la apoptosis es esencial para entender y modificar la supervivencia celular y así tener la posibilidad de controlar la intensidad de la duración de la involución en animales productores de leche.

IGF-I es un factor mitogénico que promueve la supervivencia de la célula retrasando la involución de la glándula mamaria (Hadsell *y col.*, 1996). La habilidad de IGF-I de inducir proliferación celular en la glándula mamaria ha sido demostrada en numerosos modelos *in vivo* e *in vitro* (Baumrucker y Erondy, 2000, Hadsell *y col.*, 2002). Recientemente se observó que la administración de somatotrofina bovina incrementa significativamente el porcentaje de células que expresan Ki-67, antígeno que marca proliferación celular, y que esta respuesta aumentada estaría mediada por IGF-I (Capuco *y col.*, 2001).

El concepto de que IGF-I regula la apoptosis en la glándula mamaria ha sido desarrollado en los últimos años. Estudios *in vitro* con células MCF-7 (línea celular humana de adenocarcinoma mamario) demostraron que IGF-I puede funcionar como inhibidor de la apoptosis de células mamarias (Geier *y col.*, 1992). Subsecuentes estudios realizados en ratas demostraron que la apoptosis mamaria se correlacionó con una expresión aumentada de IGFBP-5 y que actuaría como un regulador negativo de la acción de IGF-I en virtud de su habilidad para ligarse a IGF-I y reducir las actividades de supervivencia celular (Tonner *y col.*, 1995). La expresión mamaria específica de IGF-I en ratones transgénicos demostró que IGF-I promueve la supervivencia de la célula y retrasa la involución de la glándula mamaria (Hadsell *y col.*, 1996; Neuenschwander *y col.*, 1996).

En ratas, durante la lactancia los niveles de IGFBP en leche son muy bajos. Sin embargo, durante la involución de la glándula mamaria se produce un incremento de una de las IGFBP que ha sido identificada como IGFBP-5 (Tonner *y col.*, 1997). La secreción de IGFBP-5 está involucrada en el estadio inicial de la apoptosis inhibiendo la acción de IGF-I (Tonner *y col.*, 1997). Estudios realizados por Accorsi *y col.* (2002) utilizando explantes mamarios bovinos demostraron que la presencia de prolactina, somatotrofina e IGF-I reprimen la expresión de

ARNm para IGFBP-5. Este estudio sugiere la posibilidad de un rol interactivo entre somatotrofina y prolactina, donde esta última hormona estimularía la síntesis de IGF-I (factor de supervivencia) y optimizaría la acción de este factor de crecimiento por supresión de la expresión de su inhibidor, IGFBP-5.

Por otra parte, Baumrucker y Erondu (2000) postulan que existen importantes diferencias entre especies en cuanto a las funciones de IGFbps en glándula mamaria. IGFBP-5 sería importante durante la involución de la glándula mamaria en roedores, mientras que IGFBP-3 exhibiría los mayores cambios en su concentración durante la involución en bovinos.

La eficiencia en la producción de leche puede ser acrecentada por el desarrollo y utilización de productos que incrementen la persistencia de la lactancia y aceleren el proceso de involución de la glándula mamaria. Por lo tanto, para lograr esta etapa es imprescindible conocer con más detalle los mecanismos del proceso de involución, la apoptosis y proliferación celular, así como los potenciales mecanismos para aumentar las defensas de la glándula mamaria en esta etapa.

1.6.6. Impacto de la mastitis en la muerte de células epiteliales mamarias

Una significativa correlación negativa existe entre RCS en leche y la producción de leche (Raubertas y Shook, 1982). La infección es la razón primaria por el aumento de RCS. Durante las mastitis por *S. aureus* inducidas experimentalmente, un daño extensivo del tejido es evidente en regiones donde los neutrófilos parecen atravesar el epitelio (Harmon y Heald, 1982). El daño del tejido y la disminución en la producción de leche están asociados con los mecanismos de defensa inmunológica. Procesos relacionados con la infección bacteriana así como la función normal de los neutrófilos inducen muerte celular y efectos perjudiciales en la secreción de leche (Capuco y col., 1986, Long y col., 2001).

Dos formas de muerte celular predominan: muerte por necrosis y apoptosis. La relación entre mastitis y apoptosis de las células mamarias fueron evaluadas *in vivo* después de la inyección de *E. coli* dentro de la glándula mamaria en vacas Holstein en lactación (Long y col., 2001). El índice de apoptosis fue significativamente mayor en tejido con mastitis comparado con controles no infectados. La infección despertó un incremento en la expresión de genes proapoptóticos (Bax e IL-1 β -enzima convertidora), mientras que la expresión de genes antiapoptóticos (Bcl-2) se vio disminuida. Una inducción de metaloproteinasa-9 de la matriz, estromelina-1 y activador de plasminógeno tipo uroquinasa se vieron también

incrementados, lo cual es consistente con degradación de la matriz extracelular y pérdida de células durante la mastitis. El índice de expresión de ki-67 sugiere que la mastitis también incrementa la proliferación celular, tal vez como un mecanismo reparador después de la mastitis. Esta respuesta también fue consistente con un incremento en la concentración local en leche de IGF-I en las glándulas mamarias de vacas infectadas con *E. coli* (Shuster y col., 1995). Los eventos de señalización involucrados en la apoptosis de las células mamarias y proliferación inducida por *E. coli* no están bien entendidos. Los ligandos, receptores y genes que participan en las señales de muerte y proliferación no han sido aún clarificados y requieren de investigaciones futuras.

La infección con bacterias Gram positivas también induce apoptosis. La inducción de mastitis bovina por *Streptococcus agalactiae* incrementa la expresión de marcadores de apoptosis como RTPM-2 (Sheffield, 1997) y se ha observado que *S. aureus* induce apoptosis de una línea celular epitelial mamaria bovina, células MAC-T (Bayles y col., 1998, Wesson y col., 1998). El mecanismo por el cual *S. aureus* induce apoptosis de las células epiteliales mamarias *in vitro*, involucra la activación de la caspasa-8 y -3, dos componentes clave de la cascada proteolítica que lleva a la apoptosis (Wesson y col., 2000). Por otra parte, la infección de células MAC-T con *S. aureus* causa un incremento significativo en la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , mientras que la expresión de citoquinas antiinflamatorias como TGF- β e IL-8 permanece inalterada (Wesson y col., 2000).

Los trabajos realizados por Dziewanowska y col. (1999) mostraron que la internalización de *S. aureus* requiere de la interacción específica entre proteínas de unión a fibronectina y la célula del hospedador, probablemente seguido por una señal de traducción que lleva finalmente a la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedadora. El examen con microscopía electrónica de células infectadas reveló que la bacteria es internalizada vía un mecanismo que involucra la formación de pseudópodos por la membrana y luego escapa dentro del citoplasma debido a la lisis de la membrana del endosoma. Dos horas después, las células muestran desprendimiento de la matriz, plegamiento de sus membranas y vacuolización del citoplasma; todo lo cual es indicativo de que las células padecen muerte celular programada o apoptosis (Bayles y col., 1998). La internalización de *S. aureus* por parte de la célula huésped es un componente importante de la mastitis y de otras enfermedades causadas por esta bacteria, y este mecanismo podría proveer protección en contra de las defensas del hospedador y tratamientos antibióticos.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Determinar a) las modificaciones histofisiológicas que se producen durante la involución inducida de la glándula mamaria bovina, b) los mecanismos de muerte de los lactocitos, c) la distribución de los factores de crecimiento que regulan la involución de la glándula mamaria en esta especie y d) los mecanismos de la respuesta inmune inespecífica en glándulas mamarias libres de infección e infectadas con *Staphylococcus aureus* tratadas con un MRB intramamario en el momento de interrupción de la lactancia.

2.2. Específicos

- Evaluar el grado de proliferación celular en glándula mamaria cuantificando la expresión por inmunohistoquímica (IHQ) de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y Ki67.
- Caracterizar los mecanismos de muerte de los lactocitos de la glándula mamaria bovina a través de la identificación de apoptosis *in situ* y de proteínas proapoptóticas por IHQ.
- Evaluar la respuesta inmune no específica a través de la identificación y cuantificación de TNF- α en tejido mamario.
- Identificar y cuantificar células infiltrantes por técnicas histoquímicas e IHQ.
- Realizar una valoración cualitativa y cuantitativa de los patrones de expresión de IGF-I y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en tejido glandular mamario.
- Determinar similitudes y diferencias en los mecanismos de control hormonal durante la involución mamaria de animales tratados con MRB y en controles.
- Describir y comparar características morfológicas y bioquímicas de la glándula mamaria bovina durante la involución en animales tratados con un MRB y en controles.
- Realizar inferencias para la posible aplicación de tratamientos específicos, basados en la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Modificador de la respuesta biológica

El producto utilizado contiene lipopolisacárido (LPS) de una cepa no patógena de *Escherichia coli* cepa (LN02) a una concentración de 0,35 μ moles y 4,5 mg de fracciones membranosas y ribosomales de la misma cepa incorporadas en liposomas en un vehículo de base acuosa de 10 ml (Laboratorio Neomar, Buenos Aires, Argentina). La composición de los liposomas (The Liposystem Complex®, I.R.A., Milan, Italia) fue del 40% de fosfolípidos y 60% de medio hidrofílico y principio activo. La concentración de LPS fue determinada por cuantificación de 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) por método colorimétrico (Osborn, 1963). Para seleccionar la dosis de LPS de *E. coli* utilizada se efectuó en forma previa un ensayo dosis – respuesta:

3.1.1. Ensayo dosis – respuesta:

Se realizó un ensayo dosis-respuesta a los fines de determinar la concentración de MRB a utilizar a lo largo del estudio. Se utilizaron 6 vacas Holstein al final de la lactancia. Las vacas fueron asignadas en tres grupos de tratamiento al azar. Se seleccionaron dos concentraciones de LPS luego de la realización de un estudio previo que incluyó la evaluación de cuatro concentraciones diferentes de LPS. Dos vacas fueron inoculadas en forma intramamaria en los cuatro cuartos con MRB conteniendo una dosis de 0,35 μ moles de LPS (Grupo 1), dos vacas fueron inoculadas con MRB en los cuatro cuartos con dosis de 0,54 μ moles de LPS (Grupo 2) y dos vacas permanecieron sin inocular como controles (Grupo control). Las vacas controles sin inocular eran de 7^{ma} y 8^{va} lactancia, las vacas inoculadas con MRB en una concentración de 0,35 μ moles de LPS eran de 3^{ra} y 5^{ta} lactancia, mientras que las inoculadas con 0,54 μ moles de LPS eran de 2^{da} y 3^{ra} lactancia. El ordeño fue interrumpido luego de la infusión y las vacas fueron alimentadas solo con heno de alfalfa y teniendo libre acceso al agua durante el tiempo de experimentación. Muestras de secreción mamaria fueron asépticamente colectadas utilizando procedimientos estándar (Hogan y col., 1999) tres días antes de la inoculación del MRB, inmediatamente antes de la inoculación y al día 1, 2, 3 y 7 post infusión para realizar análisis bacteriológicos y recuento de células somáticas. Los dos primeros chorros de leche de cada cuarto mamario fueron descartados, los siguientes 5 ml de leche fueron colectados en recipientes de plástico estériles para análisis bacteriológicos y 30 ml en

viales plásticos para recuento de células somáticas. Los pezones fueron sumergidos en una solución yodada al 0.5% luego de la toma de muestras.

Se registró la temperatura rectal inmediatamente antes de la administración del MRB y cada 24 hs post inoculación (PI) por 7 días. Los cuartos mamarios fueron examinados clínicamente por palpación y determinación de la alteración macroscópica de la secreción mamaria. El estado clínico de la glándula se clasificó arbitrariamente sobre la base del grado de inflamación como: tejido normal, inflamación moderada e inflamación marcada. Los animales fueron sacrificados a los 11 días PI en un matadero local, donde se tomaron muestras de tejido mamario.

3.2. Animales

Se utilizaron vacas Holstein no preñadas en la etapa final de la lactancia, pertenecientes a la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA), con una producción promedio de 8 kg de leche por día hasta el momento de la experiencia y con similar número de lactancias.

Basado en estudios bacteriológicos previos, los animales incluidos en la experimentación estaban infectados con *S. aureus* en al menos dos cuartos mamarios o no infectados. Las infecciones fueron naturalmente adquiridas durante el periodo de secado o en los primeros dos meses de la lactancia anteriores a la iniciación del estudio. Se incluyeron en la experimentación cuartos mamarios de animales infectados y no infectados.

3.3. Diseño experimental

La infección de los cuartos mamarios fue considerada como covariable. El estado de infección de los cuartos mamarios fue determinado seis meses antes de la iniciación del experimento y confirmado 20 y 3 días previos a la inoculación. Los cuartos mamarios infectados fueron seleccionados al azar de vacas mostrando al menos dos cuartos infectados con *S. aureus*. De estas vacas, sólo dos cuartos fueron infundidos con MRB o placebo, el cual consistió en vehículo sin principio activo. Los cuartos no infectados fueron seleccionados a partir de vacas con ausencia de infección al momento del muestreo. Sólo dos cuartos de cada una de estas vacas fueron infundidos con MRB o placebo. Aquellas vacas no infectadas en las cuales se presentara IIM durante el período experimental, fueron excluidas del estudio. De

acuerdo con este criterio de selección, se conformaron tres grupos de 12 vacas que fueron sacrificadas a los 7, 14 y 21 días post infusión. Cuartos mamarios no infectados (n=6) e infectados con *S. aureus* (n=6) fueron incluidos en cada grupo (7, 14 y 21 días). En todos los casos la lactancia fue interrumpida luego de la infusión intramamaria. Las vacas fueron alimentadas con heno de alfalfa y tuvieron libre acceso al agua durante todo el experimento. Las muestras de secreción mamaria fueron colectadas asépticamente siguiendo procedimientos estándar (Hogan y col., 1999), tres días antes de la inoculación del MRB, inmediatamente antes de la inoculación y 48 hs post infusión para realizar análisis bacteriológicos. Luego de la toma de muestras, los pezones fueron sumergidos en antiséptico conteniendo 0.5% de solución yodada. Los animales incluidos en los tres grupos experimentales fueron sacrificados en un matadero local a los 7, 14 y 21 días post inoculación y se tomaron muestras para análisis histológicos. De acuerdo con el criterio de selección, a partir de 44 vacas disponibles, 36 fueron incluidas en el estudio.

3.4. Análisis bacteriológicos

Muestras de 10 µl de secreción mamaria fueron sembradas en placas con agar-sangre suplementadas con 5% de sangre bovina e incubadas por 48 hs en aerobiosis. Las placas fueron examinadas para determinar crecimiento bacteriano a las 24 y 48 hs. Las bacterias aisladas fueron identificadas según procedimientos estándar (Hogan y col., 1999). La presencia de una colonia de *S. aureus* en agar-sangre fue considerada como identificación positiva. La infección intramamaria fue definida como el aislamiento del mismo organismo por dos muestreos consecutivos. Para determinar el efecto del MRB en cuartos infectados con *S. aureus* la ausencia de IIM en cada grupo fue definida como dos cultivos bacteriológicos negativos antes del sacrificio.

3.5. Recuento de células somáticas

Se realizó a través de citometría de flujo utilizando un equipo automático, Somacount 300 (Bentley Instruments-Misesotta-USA). Para el análisis de los datos del ensayo dosis – respuesta (punto 3.1.1.) solo fueron considerados cuartos libres de infección intramamaria con conteos de células somáticas < 395,000 células/ml.

3.6. Obtención y procesamiento de las muestras de tejido

Inmediatamente después del sacrificio de los animales fueron tomadas muestras de tejido mamario de cada cuarto y procesadas según procedimientos histológicos de rutina. Muestras de 1 cm³ aproximadamente fueron tomadas de la porción dorso-lateral de la glándula mamaria (parénquima profundo) a una profundidad de 4 cm según descripciones previas (Nickerson y col., 1992). Posteriormente fueron fijadas en formol-buffer 10% durante 6 a 8 horas a temperatura ambiente. Luego de un lavado prolongado en agua corriente y buffer fosfato salino 0,05M pH 7,5 (PBS) las muestras se deshidrataron en concentraciones graduales crecientes de alcohol etílico, aclararon en xilol y embebieron en parafina siguiendo protocolos de rutina (Woods y Ellis, 1994). Los tacos histológicos fueron cortados en un micrótopo rotativo manual. Los cortes seriados de 5 µm de espesor fueron montados en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y secados durante 24 hs a 37 °C.

3.7. Estudios histoquímicos

Para efectuar una caracterización inicial de los tejidos, se efectuaron cortes de 5 µm de espesor, los que fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina (Biopur, Rosario). Posteriormente, y en otros cortes, se efectuaron diferentes técnicas histoquímicas. Para la identificación de mastocitos se empleó la coloración de Azul de Toluidina y para la detección específica de eosinófilos la coloración de Rojo Sirius en solución alcalina (pH 10.5).

3.7.1. Coloración con Azul de toluidina para identificar mastocitos

3.7.1.1. Solución colorante:

-Solución Stock de Azul de Toluidina:

Azul de Toluidina.....1 g
Alcohol 70°.....100 ml
Solución estable por 6 meses.

-Solución de trabajo:

Solución Stock de Azul de Toluidina.....5 ml
Solución de cloruro de sodio al 1%..... 45ml

Esta solución debe descartarse después de usar.

3.7.1.2. Procedimiento:

1. Xilol (A), 10 minutos.
2. Xilol (B), 10 minutos.
3. Alcohol 100 (A), 2 minutos.
4. Alcohol 100 (B), 2 minutos.
5. Alcohol 96, 2 minutos.
6. Alcohol 70, 2 minutos.
7. Lavar en agua destilada, 2 minutos.
8. Sumergir en la Solución colorante, 1 a 2 minutos
9. Lavar en agua destilada.
10. Alcohol 96, 10 segundos.
11. Alcohol 100 (A), 10 segundos.
12. Alcohol 100 (B), 10 segundos.
13. Xilol (A), 2 minutos.
14. Xilol (B), 2 minutos.
15. Montar

3.7.1.3. Resultados: Los mastocitos se colorean de violeta y el fondo azul.

3.7.2. *Coloración Rojo Sirius Alcalino – Hematoxilina*

3.7.2.1. Soluciones:

-Solución colorante:

Rojo Sirius F3B.....	0.5 g
Alcohol absoluto.....	50 ml
Solución acuosa de NaOH al 1%.....	1 ml
Solución acuosa de NaCl al 20%.....	4 ml
Agua destilada	45 ml

-Solución de trabajo:

Se disolvió el Sirius en agua destilada, se agregó el alcohol absoluto y rápidamente el NaOH. Se agitó varias veces hasta disolución completa. Se dejó reposar por dos horas, se agregó lentamente agitando bien el NaCl hasta la obtención de un ligero precipitado. Se dejó reposar por 24 h y luego se filtró. La solución se conservó en heladera por un período máximo de dos meses.

3.7.2.2. Procedimiento:

1. Xilol (A), 15 minutos.
2. Xilol (B), 10 minutos.
3. Alcohol 100 (A), 2 minutos.
4. Alcohol 100 (B), 2 minutos.
5. Alcohol 96, 2 minutos.
6. Alcohol 70, 2 minutos.
7. Lavar en agua destilada, 5 minutos.
8. Hematoxilina, 30 segundos.
9. Lavar rápidamente en agua destilada.
10. Lavar en agua corriente, 5 minutos.
11. Alcohol 70, 1 segundo.
12. Sirius Alcalino, 60 minutos
13. Lavar en agua corriente, 5 minutos.

14. Alcohol 70, 15 segundos.
15. Alcohol 96, 15 segundos.
16. Alcohol 100 (A), 15 segundos.
17. Alcohol 100 (B), 15 segundos.
18. Xilol (A), 3 minutos.
19. Xilol (B), 3 minutos.
20. Montar.

3.7.2.3. Resultados: Los eosinófilos y el amiloide se colorean de rojo.

3.8. Inmunohistoquímica (IHQ)

Los diferentes anticuerpos utilizados y su concentración de uso se detallan en la tabla 5. Cada anticuerpo fue probado en al menos en 5 secciones de tejidos para cada muestra. Se utilizó el método streptavidina-biotina-inmunoperoxidasa según descripciones previas de Dallard *y col.* (2005). Brevemente, las secciones fueron desparafinadas, hidratadas y tratadas con recuperación antigénica o no dependiendo del anticuerpo primario utilizado. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con 1% de H₂O₂ y las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero normal de cabra al 10%. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario 18 hs a 4°C y luego por 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo secundario biotinilado, seleccionado específicamente de acuerdo a los dos tipos de anticuerpos primarios utilizados (monoclonal o policlonal). La visualización del antígeno se realizó por el método streptavidina-peroxidasa (BioGenex, San Ramon, CA) utilizándose como cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Liquid DAB-Plus Substrate Kit - Zymed, San Francisco, CA). Finalmente los cortes fueron lavados en agua destilada, contracolorados con hematoxilina de Mayer, deshidratados y montados.

3.8.1. Controles:

Para verificar la especificidad de la técnica utilizada se realizaron diferentes controles: Reemplazo del anticuerpo primario con suero no inmune de conejo y ratón, omisión del anticuerpo primario y omisión del anticuerpo secundario biotinilado. Por otra parte, cada anticuerpo primario fue probado con un test de absorción involucrando el antígeno respectivo (15 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para excluir la posibilidad de la no supresión de la actividad de la peroxidasa endógena algunas secciones fueron incubadas con el reactivo DAB solo.

3.8.2. Procedimiento general:

1. Colocar los cortes 10 minutos en la estufa a 60°C
2. Xilol A (Desparafinar), 15 minutos.
3. Xilol B (Desparafinar), 10 minutos.
4. Alcohol 100 A (Hidratar), 2 minutos.
5. Alcohol 100 B (Hidratar), 2 minutos.
6. Alcohol 96 (Hidratar), 2 minutos.
7. Alcohol 70 (Hidratar), 2 minutos.
8. Lavar en PBS, 5 minutos (ANEXO I, página 153).
9. Recuperación antigénica^a.
10. Lavar en PBS 5 minutos.
11. Inactivación de la peroxidasa endógena. Solución de H₂O₂^b en metanol durante 20 minutos (10+10).
12. Lavar en PBS 5 minutos.
13. Secar los cortes y cubrirlos con Solución de Bloqueo^c durante 15 minutos.
14. Escurrir el exceso de solución y sin lavar cubrir con el anticuerpo primario, de acuerdo al procedimiento correspondiente.
15. Lavar en PBS (2 lavados de 5 minutos cada uno).
16. Secar los cortes y cubrirlos con el anticuerpo secundario biotilado (de acuerdo al procedimiento correspondiente) durante 30 minutos.
17. Lavar en PBS (2 lavados de 5 minutos cada uno).
18. Secar los cortes y cubrirlos con la estreptavidina-peroxidasa, 30 minutos.
19. Lavar en PBS (2 lavados de 5 minutos cada uno).
20. Secar y cubrir con la solución de cromógeno (DAB) 1 a 10 minutos (Según el Ac. Primario, ajustar en microscopio).
21. Lavar en agua destilada (2 lavados de 5 minutos cada uno).
22. Hematoxilina BIOPUR[®] Diluida 1:2 en Agua destilada, 5 a 30 segundos.
23. Lavar en agua destilada
24. Virar en agua corriente.
25. Alcohol 70, 3 minutos.
26. Alcohol 96, 3 minutos.
27. Alcohol 100 (A), 3 minutos.
28. Alcohol 100 (B), 3 minutos.
29. Xilol (A), 5 minutos.
30. Xilol (B), 5 minutos.
31. Montar

^a Recuperación antigénica:

En la tabla 5 se especifica el método de recuperación antigénica empleado para cada anticuerpo primario.

- En microondas:

- a) Llenar el Coplin con buffer citrato 0,01M pH 6.0 (ANEXO I, página 153)
- b) Colocar los preparados en el buffer citrato, tapar (tapa perforada) y calentar 3 minutos al 100%.
- c) Calentar 12 minutos al 40%,
- d) Dejar enfriar 20 minutos.

- Con Buffer EDTA en olla a presión:

- a) Precalentar el Coplin conteniendo el Buffer EDTA hasta 90-100°C.
- b) Colocar los preparados en el Buffer EDTA (ANEXO I, página 153), tapar (tapa perforada) y mantener a temperatura durante 30 minutos.
- c) Dejar enfriar 20 minutos.

- Digestión con Tripsina (*Zymed Digest-All Cat No. 00-3006*):

Luego de bloquear la peroxidasa endógena en el protocolo de IHQ, lavar los preparados en agua destilada y aplicar la enzima por 10 minutos a 37°C. Realizar luego 3 lavados de 5 minutos c/u en PBS. Proseguir con el protocolo de IHQ.

^b Solución de H₂O₂:

Se prepara con 36 ml de metanol y 4 ml de H₂O₂ para 10 portaobjetos dorso con dorso en el Coplin. A los 10 minutos agregar 4 ml adicionales de H₂O₂.

^c Solución de Bloqueo:

ANEXO I (Página 154).

Tabla 5: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados, sus diluciones de trabajo, método de recuperación antigénica empleado y procedencia.

	Huésped	Dilución	Recuperación antigénica (RA)	Procedencia
<i>Anticuerpos primarios</i>				
IGF-I (policlonal)	Conejo	1:50	Microondas	GroPep, Adelaide, Australia
VEGF (policlonal)	Conejo	1:30	Microondas	BioGenex, San Ramon, CA
PCNA (clon PC-10)	Ratón	1:400	Microondas	Novocastra Laboratories, Newcastle, UK
Ki67 (clon BGX-Ki67)	Ratón	1:40	Microondas	BioGenex, San Ramon, CA
CD14 (clon RPA-M1)	Ratón	1:40	Enzimática (tripsina)	Zymed, San Francisco, CA
TNF- α (anti oveja); policlonal	Conejo	1:150	Sin RA	Chemicon, San Francisco, CA
Bax (policlonal)	Conejo	1:30	Sin RA	BioGenex, San Ramon, CA
Caspasa-3 activa (policlonal)	Conejo	1:400	Olla a presión con buffer EDTA	R&D Systems, Minneapolis, MN
<i>Anticuerpos secundarios</i>				
Anti conejo IgG	Cabra	1:300		Zymed, San Francisco, CA
Anti ratón IgG	Cabra	1:120		Chemicon, San Francisco, CA

3.9. Detección de apoptosis *in situ*

Para la detección de células apoptóticas en animales tratados con MRB y en controles durante la involución se utilizó la técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*). Este método utiliza la enzima *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) para catalizar la unión de dATP y dUTP-digoxigenina al extremo 3'OH libre del DNA fragmentado. Los nucleótidos incorporados forman un heteropolímero al azar, que se revela con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa (Figura 2). Se utilizó el kit comercial para detección de apoptosis *in situ* ApopTag® Plus–Peroxidasa (Chemicon Internacional, Temecula, CA).

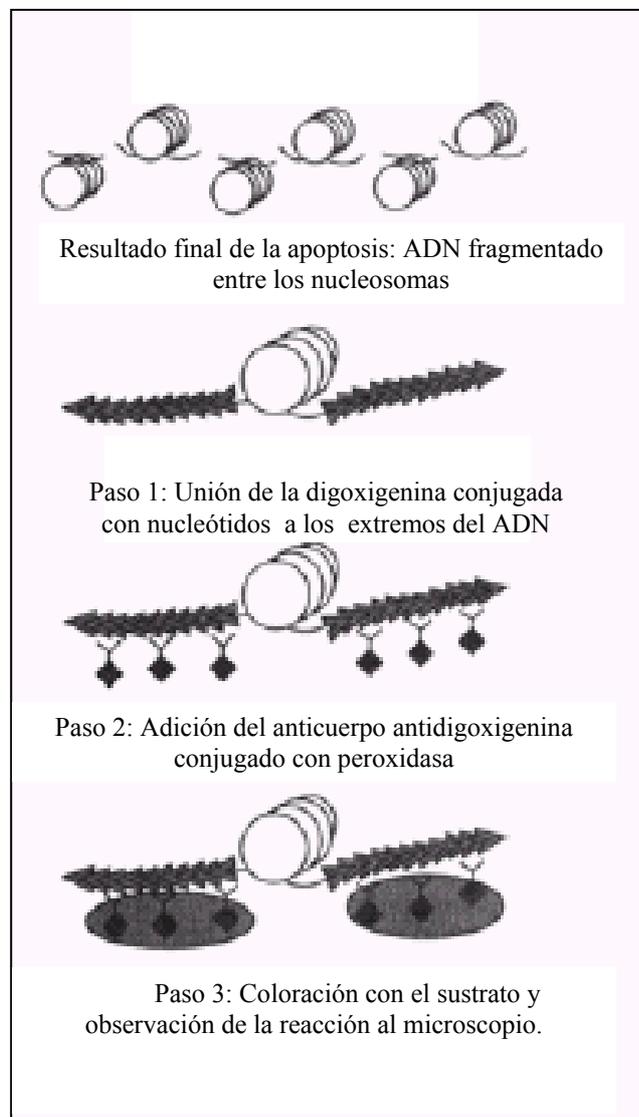


Figura 2: Metodología empleada por el kit de detección de apoptosis *in situ* ApopTag® Plus–Peroxidasa (Chemicon Internacional, Temecula, CA).

3.9.1. Procedimiento general:

1. Colocar los cortes 10 minutos en la estufa a 60°C
2. Xilol A (Desparafinar), 15 minutos.
3. Xilol B (Desparafinar), 10 minutos.
4. Alcohol 100 A (Hidratar), 2 minutos.
5. Alcohol 100 B (Hidratar), 2 minutos.
6. Alcohol 96 (Hidratar), 2 minutos.
7. Alcohol 70 (Hidratar), 2 minutos.
8. Lavar en PBS, 5 minutos.
9. Recuperación antigénica con proteinasa K.
 - a) Secar los cortes y colocarlos en cámara húmeda en la estufa de 25°C.
 - b) Incubar con la enzima durante 10 minutos.
10. Lavar en PBS, 3 lavados de 5 minutos cada uno.
11. Inactivación de la peroxidasa endógena. Solución de H₂O₂ en metanol¹ durante 20 minutos.
12. Lavar en PBS (2 lavados de 5 minutos cada uno).
13. Escurrir el exceso de solución, colocar en cámara húmeda y cubrir con el buffer de equilibrio² durante 10 minutos cubriendo luego el preparado con un folio o plástico³
14. Escurrir el exceso de líquido y, sin lavar, colocar la enzima TdT⁴. Incubar a 37°C (en estufa) durante 60 minutos.
15. Lavar en Coplin (pequeños de 5 vidrios) con “Stop Wash Buffer”⁵. Agitar durante 15 segundos y luego dejar lavando 10 minutos.
16. Lavar en PBS (3 lavados de 2 minutos cada uno).
17. Escurrir el exceso de líquido, colocar en cámara húmeda y cubrir con anti-Digoxigenina conjugada⁶. Colocar el plástico. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C en estufa)
18. Lavar con PBS, 4 lavados de 2 minutos cada uno.
19. Secar y cubrir con la solución de cromógeno (DAB⁷) 1 a 10 minutos ajustar observando la reacción al microscopio.
20. Lavar en agua destilada, 2 lavados de 5 minutos cada uno.
21. Hematoxilina BIOPUR[®] Diluida 1:2 en Agua destilada, 5 a 30 segundos.
22. Lavar en agua destilada
23. Virar en agua corriente.
24. Alcohol 70, 3 minutos.
25. Alcohol 96, 3 minutos.
26. Alcohol 100 (A), 3 minutos.
27. Alcohol 100 (B), 3 minutos.
28. Xilol (A), 5 minutos.
29. Xilol (B), 5 minutos.
30. Montar

3.9.2. Controles:

Control positivo: cortes provistos por el kit (glándula mamaria de rata a los 5 días del destete de las crías).
Control negativo: Reemplazo del volumen de la enzima TdT por agua.

3.9.3. Preparación de los reactivos:

¹Solución de H₂O₂: Se prepara con 36 ml de metanol y 4 ml de H₂O₂ para 10 portaobjetos dorso con dorso en el Coplin. A los 10 minutos agregar 4 ml adicionales de H₂O₂.

²Buffer de equilibrio:

Superficie	Volumen
1 cm ²	13 µl

³Folios o cubres de plástico: Cortar de acuerdo a la superficie del preparado. Permite una mejor distribución de volúmenes pequeños de reactivos por la superficie.

⁴Enzima TdT: debe ser preparada en el momento de usar.

Preparación de la enzima:

Preparados	Enzima TdT (30%)	Buffer de Reacción (70%)
1	9 µl	21 µl

⁵Stop Wash Buffer:

Diluir 1 ml Stop Wash Madre en 34 ml de H₂O destilada y colocar en Coplin para 10 preparados.

⁶Anti-Digoxigenina conjugada: Sacar de la heladera el volumen necesario para los preparados (13 µl por preparado) y colocar en un Eppendorf a temperatura ambiente hasta el momento de usar.

⁷DAB:

Preparación de la DAB:

Preparados	DAB	Buffer sustrato
1	1 µl	49 µl

3.10. Análisis de imágenes

El análisis de las imágenes fue realizado usando el programa Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA). Las imágenes fueron digitalizadas con una video cámara color CCD (Sony, Montvale, NJ) montada en un microscopio de luz convencional (Olympus BH-2, Olympus Co., Japan) utilizando objetivos de 10X y 40X. Se digitalizaron campos microscópicos que cubrieron toda el área analizada y se guardaron bajo el formato TIFF con 24 bits de color verdadero. La resolución de las imágenes fue fijada en 640 x 480 pixels. A la magnificación usada cada píxel de la imagen correspondía a 0,26 µm, y cada campo representaba un área de tejido de 0,02 mm².

3.10.1. Cuantificación de la IHQ

Los detalles metodológicos del análisis de imágenes como un método validado para cuantificar niveles de expresión fueron previamente descriptos (Dallard *y col.*, 2005, Ellis *y col.*, 2005; Ortega *y col.*, 2006). Brevemente, el área marcada por IHQ por la reacción del anticuerpo, fue calculada como porcentaje del área total evaluada a través de análisis de

segmentación de colores, localizando todos los objetos de color específico (marcación marrón). La marcación marrón fue seleccionada con una sensibilidad de 4 (máximo 5) y luego se aplicó una máscara para separar los colores de forma permanente. El porcentaje de área inmunomarcada (máscara negra) fue calculado para al menos 50 imágenes en cada una de las siguientes estructuras: alvéolos, conductos y tejido intersticial.

La inmunomarcación de IGF-I, VEGF, TNF- α y Bax se cuantificó utilizando la metodología antes descrita.

3.10.2. Evaluación morfométrica y cuantificación de células infiltrantes

Para la evaluación morfométrica se digitalizaron 40 imágenes al azar a bajo aumento (10X) de preparados de los diferentes grupos experimentales, coloreados con Hematoxilina-Eosina (Biopur, Rosario). Se calculó la relación parénquima/estroma de todos los grupos experimentales y el área ocupada por estroma se expresó en porcentaje.

Para medir infiltración celular se digitalizaron 40 imágenes al azar de cada preparado coloreado con las diferentes técnicas histoquímicas empleadas a un aumento de 40X. Se calculó la cantidad de células por unidad de área (mm^2).

3.10.3. Evaluación y cuantificación de la proliferación celular

La proliferación celular se evaluó a través de la inmunomarcación de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y Ki67. PCNA es una proteína de 36 Kd, la cual está altamente conservada entre especies. El PCNA funciona como un cofactor de la ADN polimerasa- δ tanto en la fase S del ciclo celular como así también en la síntesis de ADN asociado con los mecanismos de reparación del daño del mismo. El Ki-67, es una proteína nuclear presente durante las fases G1, S G2 y M del ciclo celular y su expresión tiene relación directa con la actividad proliferativa en diferentes tejidos. La marcación de PCNA y Ki67 fue revelada por IHQ utilizando anticuerpos monoclonales específicos (Tabla 5).

Todas las células inmunomarcadas para PCNA se consideraron positivas. Estas presentaron reacción nuclear positiva con alta heterogeneidad en la intensidad de la tinción. Por ello, se establecieron 3 rangos de intensidad: débil (1+), moderado (2+) e intenso (3+). Se contaron en cada preparado, como mínimo 2000 células epiteliales alveolares, sin considerar

células mioepiteliales, en un mínimo de 20 campos. Sólo se cuantificaron las que mostraron la tinción nuclear más intensa (PCNA 3+) y el resultado se expresó como porcentaje de estas células intensamente marcadas.

Para obtener el porcentaje de proliferación celular con el antígeno ki67 todas las células que presentaron reacción nuclear homogénea e intensa se consideraron positivas. Se contaron en cada preparado como mínimo 2500 células del epitelio alveolar y del estroma de la glándula mamaria en un mínimo de 20 campos y a una magnificación de 40X.

3.10.4. Evaluación y cuantificación de la apoptosis

Luego de la realización de la técnica de TUNEL en todos los grupos experimentales se calculó el porcentaje de células que presentaron reacción nuclear positiva (coloración marrón), para ello se obtuvieron un mínimo de 20 campos por preparado en una magnificación de 40X y se contabilizaron 2500 células del parénquima y del estroma de la glándula mamaria. Las células fueron clasificadas como epiteliales con marcación (+), estromales con marcación (+), epiteliales con marcación (-) y estromales con marcación (-). Las células fueron contadas como epiteliales si formaban parte del tejido secretor lo que incluyó a las células epiteliales y mioepiteliales y posibles leucocitos que pudieran estar presentes en el lumen alveolar. Todas las células propias del tejido conectivo fueron clasificadas como células estromales incluyendo fibroblastos, adipocitos y células endoteliales; también se contabilizaron los leucocitos (Wall *y col.*, 2005).

Luego de la realización de la IHQ para caspasa-3 activa, de la misma manera que para la técnica de TUNEL, se contabilizaron las células epiteliales y estromales que mostraron marcación positiva en el área perinuclear y en el citoplasma y se obtuvieron los porcentajes.

3.11. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos de RCS en el estudio dosis-respuesta se empleó un diseño experimental completamente randomizado con datos recolectados en una secuencia de puntos distribuidos en el tiempo en forma desigual. La unidad experimental fue el cuarto y la variable dependiente fue el \log_{10} del RCS. Se consideraron dos factores, tratamiento y tiempo. Se aplicó un Proc Mixed (SAS®, SAS Institute Inc.) utilizando la sentencia repetida con una

matriz de covarianza no estructurada. El proceso de decisión relativo a la estructura de la covarianza fue asistido usando el valor de probabilidad del log. ya que la variable “día” es cuantitativa el log. fue modelado como una función polinomial de “día”. Los efectos incluidos en el modelo fueron tratamiento, día, día*tratamiento, día*día, día*día*tratamiento y el nivel de significación fue de 0,05. Para cada tratamiento se obtuvieron curvas cuadráticas.

Para el resto de los análisis se utilizaron test estadísticos paramétricos, convenientemente seleccionados de acuerdo con Spiegel (1991) y Norman y Streiner (1996).

Media y Error Standard de la Media (SEM). La tendencia central se expresó por medio de la media (X) y la dispersión por el Error Standard de la Media (SEM).

Análisis de la varianza (ANOVA). El análisis de varianza se utilizó para decidir si entre los grupos analizados había alguno diferente al resto, o sea que la media de algún grupo difería significativamente del resto.

Test de comparaciones múltiples de Duncan. Se utilizó como post-test, luego del ANOVA para identificar cuales grupos eran diferentes significativamente.

Todas las estadísticas fueron calculadas utilizando el software SPSS (versión 11.0 para Windows, SPSS Inc. ©). Para todos los test el nivel de significancia se fijó en $P < 0.05$.

3.12. Normas éticas y de bioseguridad.

Los procedimientos efectuados con los animales de experimentación fueron realizados de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - National Research Council, 1996*). Se prestó especial atención en el uso y manejo de residuos de drogas o reactivos potencialmente contaminantes.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayo dosis – respuesta

4.1.1. Recuento de células somáticas (RCS)

Se observó un pronunciado incremento del RCS en secreciones mamarias de vacas del grupo 1 y 2 a las 24 hs PI, el cual fue seguido por una disminución lenta hacia el último muestreo. El pico máximo del log de RCS a las 24 hs PI para el grupo 1 y 2 fue de 6.94 y 6.74 respectivamente. A la inversa, el RCS en el grupo control mostró un lento incremento sobre el periodo de muestreo alcanzando el mayor valor a los 7 días PI (log 6.91) (Figura 3). Los efectos del tratamiento, día, día*tratamiento y día*día* tratamiento fueron significativos ($P < 0.05$). La ecuación cuadrática mostró ser adecuada para la regresión del log. en base día. Aunque los modelos para el grupo 1 y 2 fueron similares, no fueron paralelos ni coincidentes ($P < 0.05$).

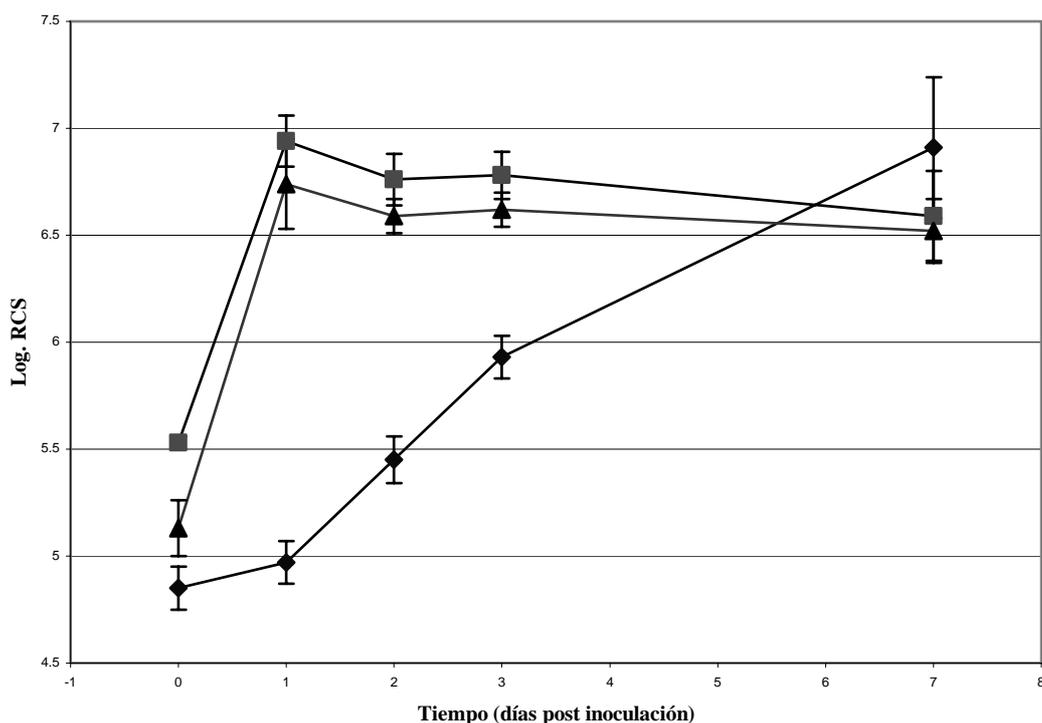


Figura 3: Medias del recuento de células somáticas de cuartos mamarios inoculados con un modificador de la respuesta biológica a base de lipopolisacárido bacteriano al final de la lactancia en vacas Holstein. Control (◆): cuartos inoculados con placebo; Grupo 1 (■): cuartos inoculados con modificador de la respuesta biológica (MRB) conteniendo 0,35 μmol de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*. Grupo 2 (▲): cuartos inoculadas con MRB conteniendo 0,54 μmol de LPS de *Escherichia coli*. Las barras de error representan el desvío estándar.

4.1.2. Alteraciones clínicas:

A las 24 hs PI se apreciaron cambios macroscópicos de la leche, acompañados de inflamación. A la palpación, a las 24 hs PI, se registró inflamación leve (grado 1) en los animales inoculados con ambas dosis de MRB. Este grado de inflamación leve se mantuvo hasta finalizar el período de observación en tres cuartos mamarios de una vaca. De los cuartos inoculados, solamente uno presentó infección (subclínica) por un patógeno mayor (*Streptococcus dysgalactiae*) al inicio del ensayo y en consecuencia no fue considerado.

4.1.3. Temperatura rectal:

En el primer ensayo los animales fueron inoculados por la mañana, mientras que en el segundo, la inoculación se realizó por la tarde. En el primer caso, se detectó a las 12 hs PI, un pico de temperatura de 40,7°C y 40,4°C en los animales inoculados con MRB conteniendo 0,35 µg de KDO de LPS y 0,54 µg de KDO de LPS, respectivamente. Posteriormente las curvas de temperatura siguieron una tendencia similar a la del control sin inocular. En el segundo ensayo no se observó una tendencia similar al primero. Las posibles discrepancias pueden radicar en las distintas horas del día en que se llevaron a cabo los ensayos, ya que se considera que la temperatura basal puede determinarse con mayor exactitud por la mañana y sin someter a excitación a los animales.

4.2. Estado de infección de la glándula mamaria

La proporción de cuartos infectados con *S. aureus* en los diferentes grupos experimentales a los 6, 13 y 20 días de involución se muestran en la tabla 6. De acuerdo al criterio usado para definir la IIM, en los animales sacrificados a los 7 días de la involución la IIM por *S. aureus* fue temporalmente no detectada en cuatro cuartos tratados con MRB y en un cuarto tratado con placebo. En los animales sacrificados a los 14 días, *S. aureus* fue temporalmente no detectado en un cuarto tratado con MRB y en un cuarto tratado con placebo, mientras que en los animales sacrificados a los 21 días *S. aureus* fue detectado tanto en tratados con MRB como en los controles tratados con placebo.

Tabla 6: Proporción de cuartos mamarios infectados luego de la infusión intramamaria de un modificador de la respuesta biológica (MRB) o placebo en cuartos infectados con *S. aureus* durante la involución.

Tiempo post infusión (días)	Tratados con MRB	Tratados con placebo
6	2/6	5/6
13	5/6	5/6
20	6/6	6/6

4.3. Recuento de células somáticas

De acuerdo con la calibración del equipo utilizado para RCS, sólo fue posible enumerar hasta concentraciones de 10.000.000 cél./ml. Consecuentemente, a los efectos de ilustrar el comportamiento de los RCS en los distintos grupos se fijaron tres concentraciones de RCS y se obtuvieron las proporciones de cuartos en cada concentración para cada día de observación. En las tablas 7 y 8 se muestran los valores obtenidos para las vacas sacrificadas a los 21 días post inoculación. A partir de las 48 hs post inoculación todos los cuartos tratados con MRB o con placebo mostraron RCS superiores a 1.000.000 cél./ml, manteniéndose la mayoría en valores >4.000.000 cél./ml hasta el fin del período de observación.

Tabla 7: Proporción de cuartos con valores crecientes de recuentos de células somáticas en cuartos infectados con *S. aureus* tratados con MRB o con placebo.

Día	<1.000.000 Placebo/tratado	1.000.001 - 4.000.000 Placebo/tratado	>4.000.000 Placebo/tratado
0	2/3	2/2	2/1
2	0/0	2/0	4/6
4	0/0	2/1	4/5
6	0/0	0/0	6/6
8	0/0	1/2	5/4
10	0/0	1/0	5/6
12	0/0	1/0	5/6
14	0/0	1/0	5/6
16	0/0	0/1	6/5
18	0/0	0/0	6/6
20	0/0	0/0	6/6

En el grupo no infectado tratado con placebo, la elevación del RCS fue más lenta que en el grupo tratado con MRB, el cual a partir de las 48 hs de observación mostró la mayoría de los cuartos con RCS superiores a 4.000.000 cél./ml. Esta tendencia se alcanzó luego del sexto día de observación para la mayoría de los cuartos tratados con placebo.

Tabla 8: Proporción de cuartos con valores crecientes de recuentos de células somáticas en cuartos no infectados tratados con MRB o con placebo.

Día	<1.000.000	1.000.001 - 4.000.000	>4.000.000
	Placebo/tratado	Placebo/tratado	Placebo/tratado
0	4/3	2/2	0/1
2	3/0	2/0	1/6
4	0/0	4/0	2/6
6	0/0	0/0	6/6
8	0/0	0/0	6/6
10	0/0	0/0	6/6
12	1/1	1/1	4/4
14	0/0	2/1	4/5
16	0/0	1/0	5/6
18	0/0	1/0	5/6
20	0/0	0/0	6/6

4.4. Hallazgos histopatológicos en glándula mamaria infectada con *S. aureus*

Se realizó una caracterización microscópica del tejido glandular mamario de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* tratados con MRB o placebo. En todos los cortes evaluados se observaron lesiones histopatológicas con diferente compromiso del parénquima y estroma mamario (Figuras 4 y 5).

En tres cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* tratados con MRB, se observaron lesiones inflamatorias focales con pérdida de la arquitectura del tejido mamario con necrosis de las células epiteliales que tapizan los alvéolos y reemplazo por infiltrado inflamatorio con predominio de eosinófilos, macrófagos y en menor escala linfocitos. Además, se observó la presencia de exudado seroso y abundantes vasos sanguíneos capilares (hiperemia). En el tejido conectivo interalveolar e interlobulillar se observaron abundantes fibroblastos con núcleos globosos de cromatina laxa y nucléolo evidente. Las lesiones descritas fueron focalizadas, extendiéndose por el lobulillo en forma completa o incompleta, intercalándose con lobulillos sin lesiones aparentes (Figura 4).

En los cuartos restantes crónicamente infectados tratados con MRB o placebo, se observaron dos tipos de lesiones: focales y difusas, distribuidas por todo el parénquima mamario, con pérdida de la arquitectura de los alvéolos y conductos mamarios, necrosis de las células epiteliales y reemplazo por gran cantidad de linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y en menor número eosinófilos y neutrófilos. Se observaron abundantes macrófagos con núcleos globosos desplazados hacia la periferia y citoplasmas vacuolados.

Algunos alvéolos mostraron sus lúmenes reducidos. Se observaron zonas de hiperplasia de la pared alveolar y de los conductos excretores compatibles con lesiones crónicas (Figura 5).

En los cuartos mamarios no infectados no se detectaron lesiones aparentes, sólo en un número reducido de muestras, en cuartos tratados con MRB, se observaron pequeñas zonas de infiltrado inflamatorio focalizadas en el interior del lobulillo con predominio de eosinófilos.

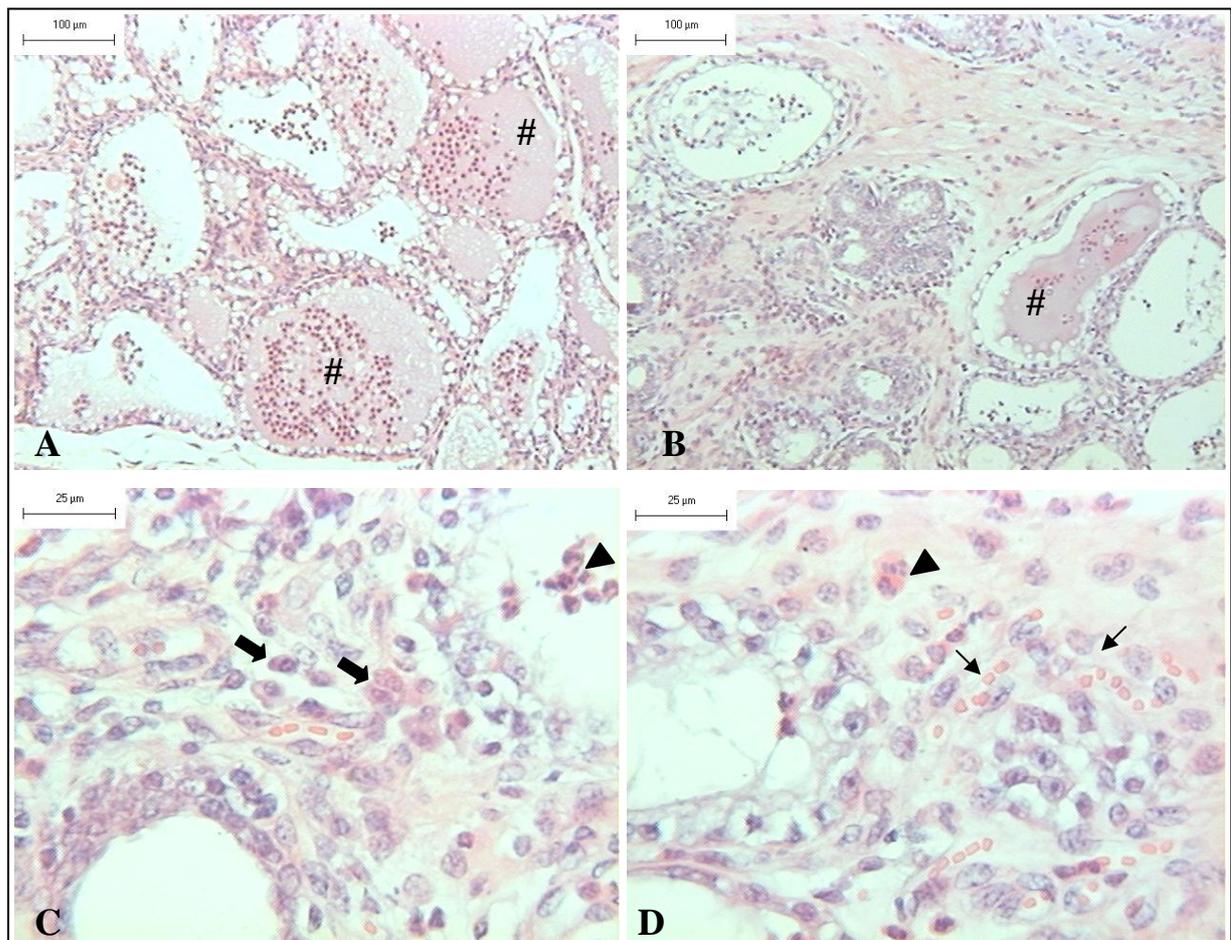


Figura 4: Secciones histológicas de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* tratados con MRB a los 7 días del secado. Coloración: hematoxilina-eosina. A y B: Alvéolos mamarios distendidos, en sus lúmenes se observan abundantes células inflamatorias y secreción (#). C y D: Pérdida de la arquitectura del epitelio alveolar, exudado inflamatorio en el intersticio con abundantes macrófagos (flechas gruesas) y eosinófilos (puntas de flechas). Se observan vasos sanguíneos capilares con glóbulos rojos en su interior (flechas finas).

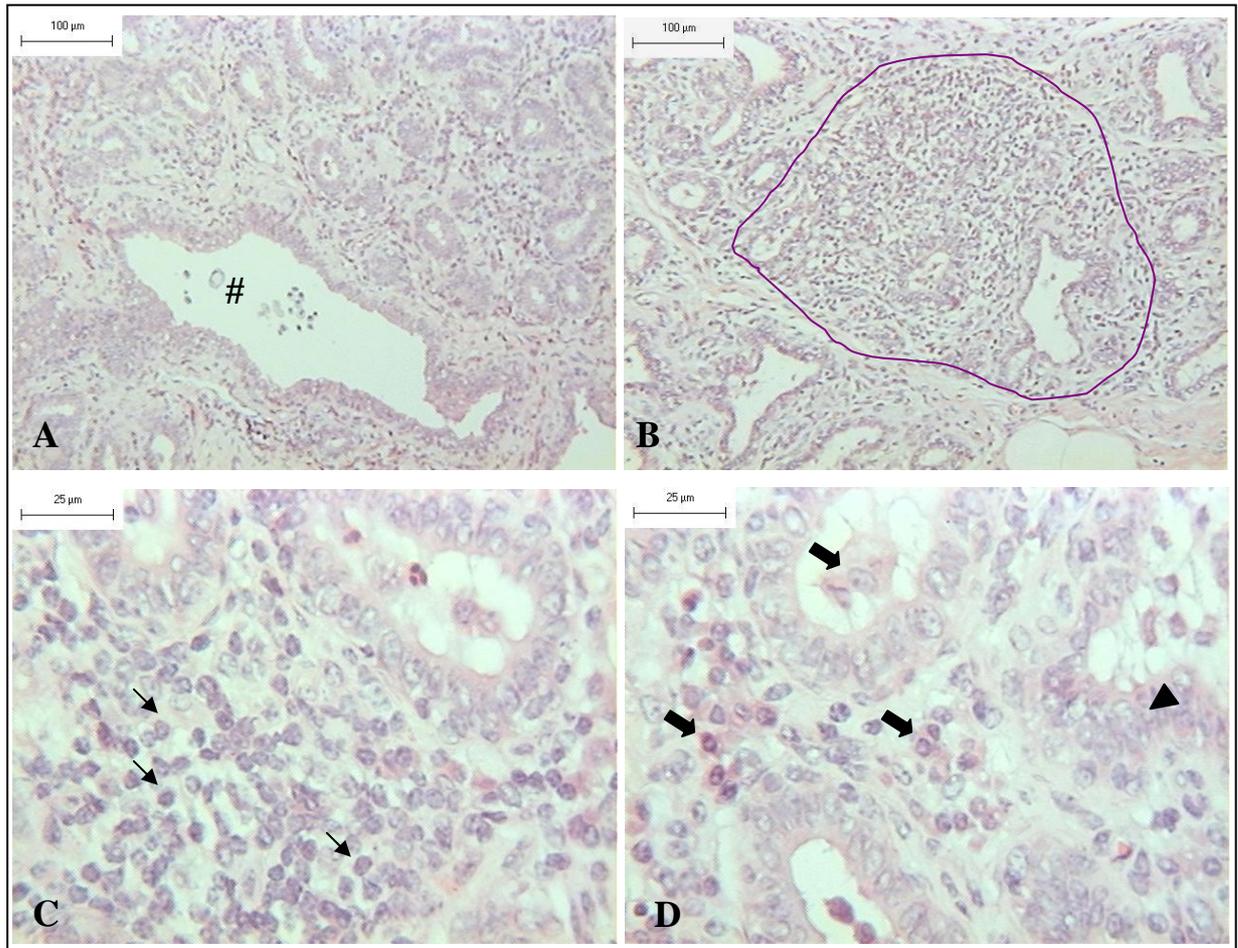


Figura 5: Secciones histológicas de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* tratados con placebo a los 14 días del secado. Coloración: hematoxilina-eosina. A: Lesión difusa (infiltrado celular en el tejido conectivo interalveolar). Se observa un conducto excretor interlobulillar (#) con su epitelio de revestimiento hiperplásico. B) Se demarca una lesión focal donde se observa infiltración celular y pérdida de la arquitectura de los alvéolos mamarios. C y D): Infiltrado de células inflamatorias con predominio de linfocitos (flechas finas) y macrófagos (flechas gruesas). Se observa hiperplasia del epitelio alveolar (punta de flecha).

4.5. Análisis de células infiltrantes

4.5.1. Identificación y cuantificación de mastocitos

Los resultados de la cuantificación de mastocitos/ mm² en cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados, tratados con MRB y placebo se detallan en la tabla 9.

En cuartos mamarios no infectados tratados con MRB y placebo no se observaron diferencias entre tratamientos en los diferentes estadios de la involución evaluados. A los 14 y

21 días del secado el recuento de mastocitos fue significativamente mayor ($P<0.05$) en tratados con MRB y placebo que el observado al día 7 (Figura 6).

En cuartos mamarios infectados con *S. aureus*, tratados con MRB, el número de mastocitos fue significativamente mayor ($P<0.05$) al observado en cuartos infectados tratados con placebo en los diferentes estadios evaluados. En cuartos tratados con MRB y placebo, el número de mastocitos se incrementó con el progreso de la involución observándose un aumento significativo ($P<0.05$) al día 21 del secado (Figura 7).

Tabla 9: Cuantificación de mastocitos en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados tratados con modificador de la respuesta biológica (MRB) y placebo durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	55.977 (1.804) ^c	37.917 (6.321) ^d	30.462 (3.426) ^d	31.477 (2.772) ^d
14 días	61.022 (3.327) ^c	39.435 (1.602) ^d	56.582 (3.741) ^c	55.375 (5.473) ^c
21 días	104.512 (4.342) ^a	82.480 (3.081) ^b	67.368 (2.746) ^c	60.396 (3.542) ^c

Los valores representan medias del número de mastocitos/ $\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$; ^{a,b,c,d} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P<0.05$).

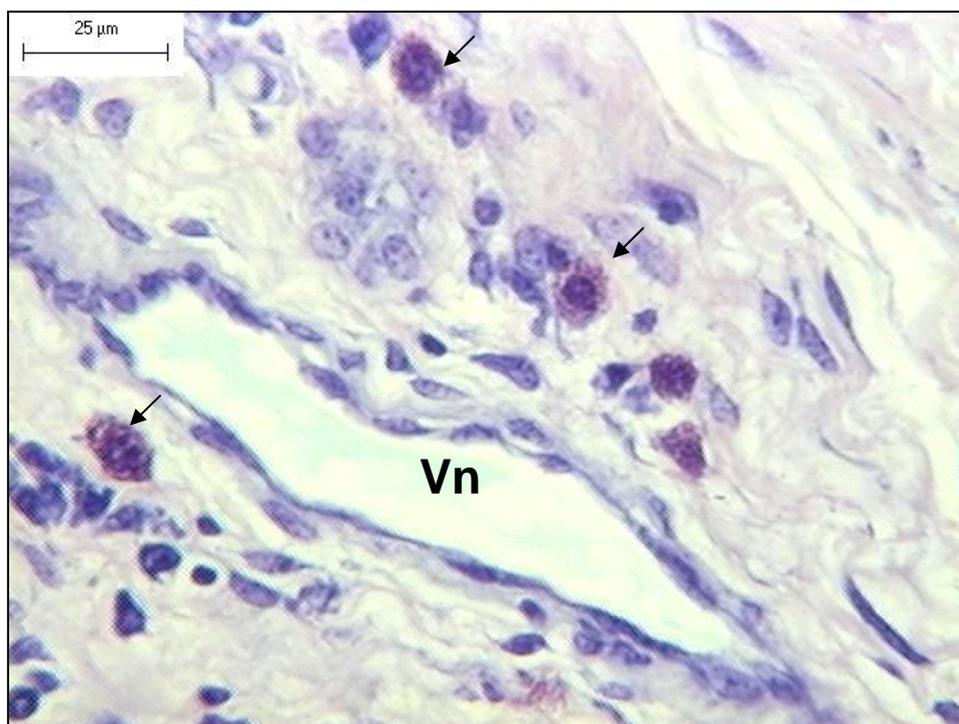


Figura 6: Coloración con Azul de Toluidina en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con MRB al día 14 del secado. Las flechas indican mastocitos con gránulos citoplasmáticos intensamente teñidos. (Vn) Vénula.

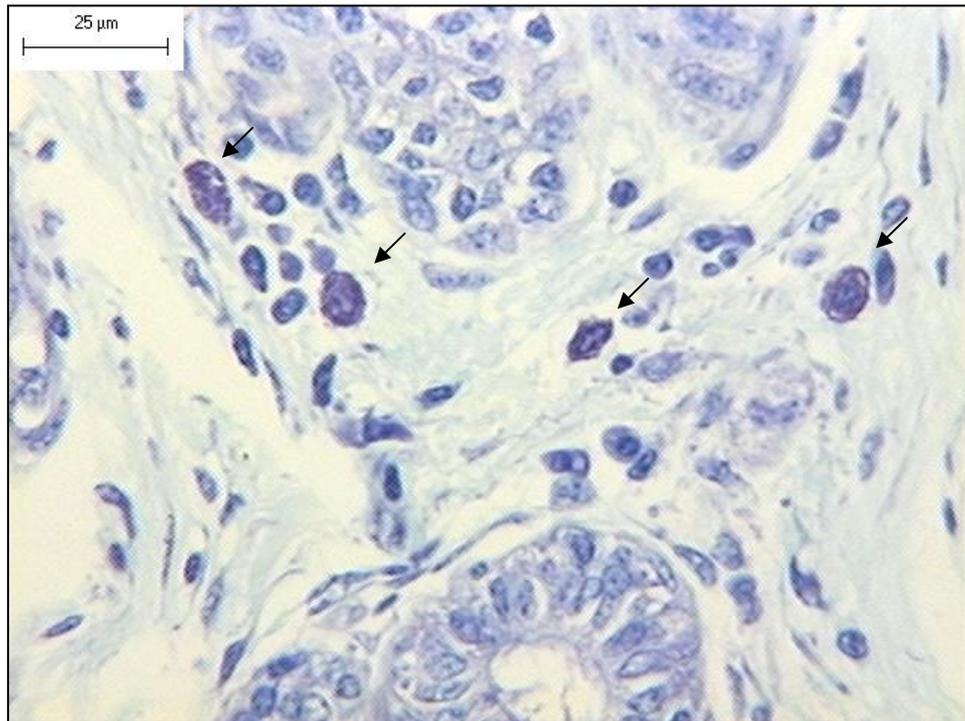


Figura 7: Coloración con Azul de Toluidina en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*, tratada con MRB al día 21 del secado. Las flechas indican mastocitos con gránulos citoplasmáticos intensamente teñidos.

4.5.2. Identificación y cuantificación de eosinófilos

Los resultados de la cuantificación de eosinófilos/ mm² en cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados, tratados con MRB y placebo se detallan en la tabla 10.

En cuartos mamarios no infectados tratados con MRB y placebo no se observaron diferencias entre tratamientos y en los diferentes estadios de la involución evaluados, excepto al día 7 del secado donde se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) del número de eosinófilos en el grupo tratado con MRB (Figura 8).

En cuartos mamarios infectados con *S. aureus*, tratados con MRB, no se observaron diferencias significativas entre los distintos periodos del secado estudiados. En cuartos infectados tratados con placebo, el número de eosinófilos al día 7 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) al observado al día 14 y 21 del secado (Figuras 9 y 10).

El número de eosinófilos fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en cuartos infectados que en no infectados independientemente del tratamiento recibido.

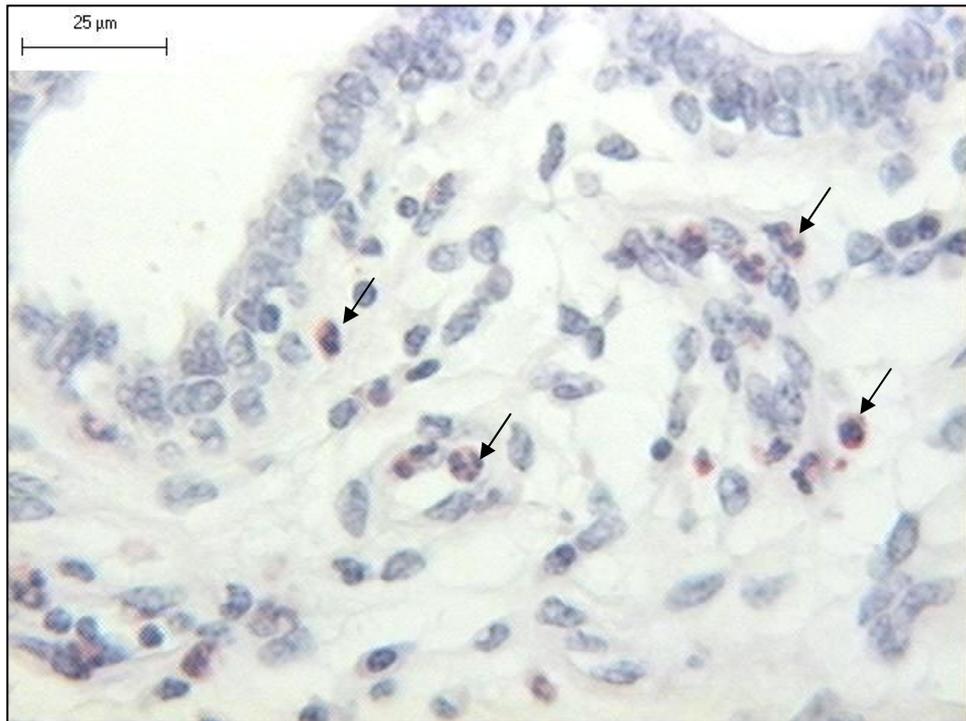


Figura 8: Coloración Rojo Sirius-Alcalina en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con MRB a los 7 días del secado. Las flechas indican eosinófilos teñidos de rojo en el estroma mamario.

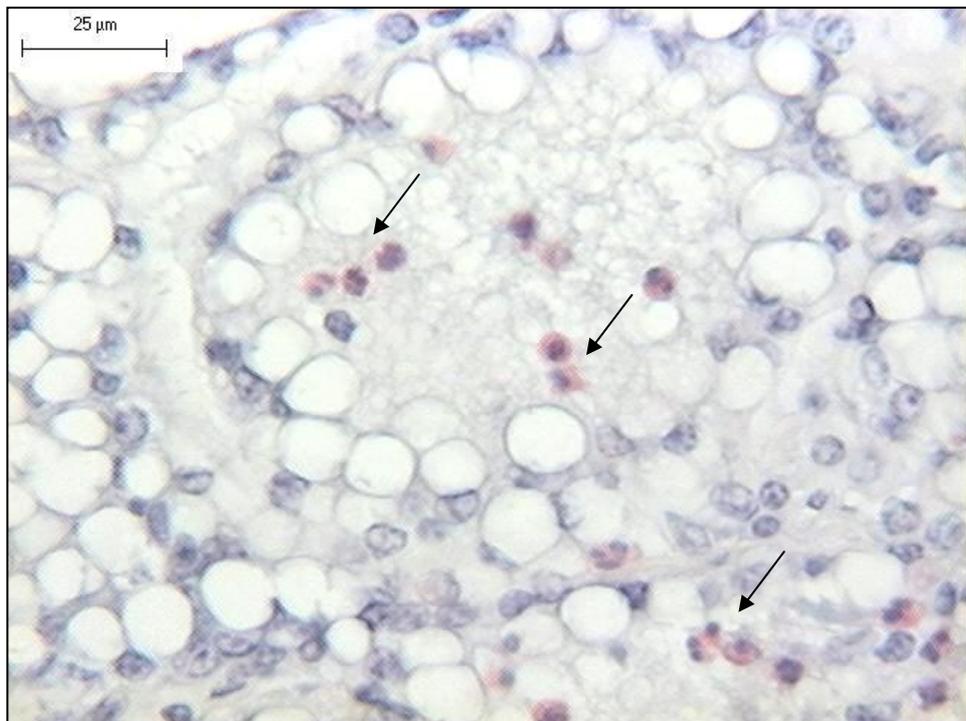


Figura 9: Coloración Rojo Sirius-Alcalina en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*, tratada con placebo a los 14 días del secado. Las flechas indican eosinófilos teñidos de rojo en el interior de los alvéolos mamarios.

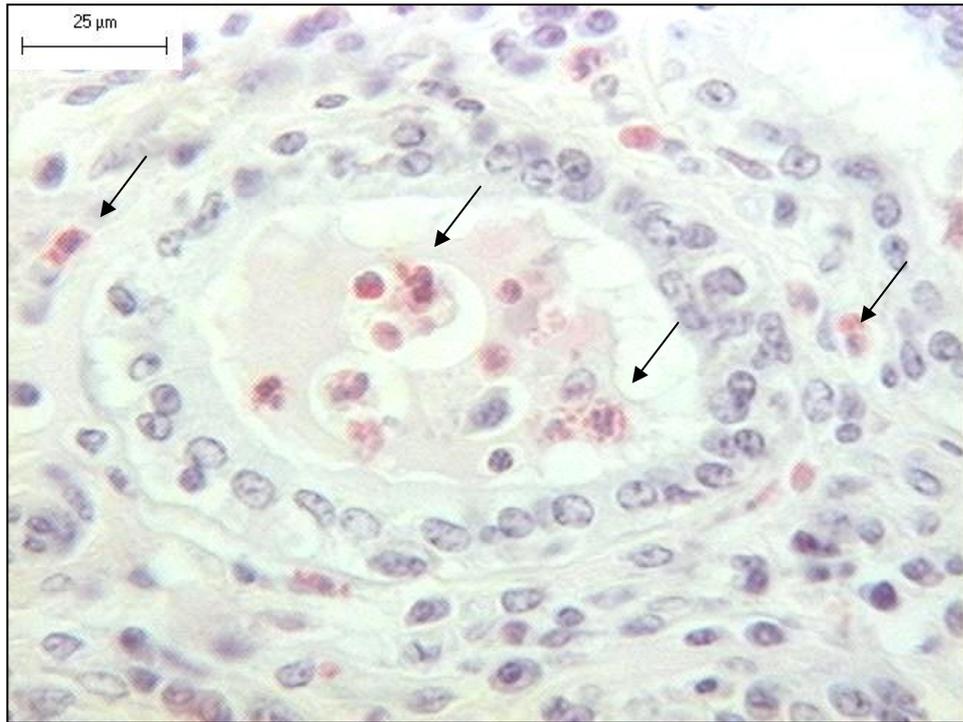


Figura 10: Coloración Rojo Sirius-Alcalina en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*, tratada con MRB a los 7 días del secado. Las flechas indican eosinófilos teñidos de rojo en el interior de los alvéolos y en el estroma mamario.

Tabla 10: Cuantificación de eosinófilos en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados tratados con modificador de la respuesta biológica (MRB) y placebo durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	151.322 (18.934) ^{a,b}	179.407 (14.589) ^a	88.150 (8.432) ^{c,f}	42.337 (6.298) ^g
14 días	134.495 (15.770) ^{b,c,d}	114.365 (14.981) ^{d,e}	50.185 (0.879) ^g	58.157 (10.316) ^{f,g}
21 días	153.692 (9.583) ^{a,b}	120.22 (10.343) ^{c,d,e}	49.632 (2.848) ^g	29.118 (3.641) ^g

Los valores representan medias del número de eosinófilos/ mm² ± SEM; ^{a,b,c,d,e,f,g} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas (P<0.05).

4.5.3. Identificación y cuantificación de monocitos – macrófagos (CD14).

La cuantificación de monocitos – macrófagos inmunomarcados con anti CD14 en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados tratados con MRB y placebo se detalla en la tabla 11.

Tabla 11: Cuantificación de monocitos-macrófagos en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados tratados con modificador de la respuesta biológica (MRB) y placebo durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	110.115 (2.247) ^a	103.142 (1.444) ^{b,c}	103.124 (3.161) ^{b,c}	82.131 (1.166) ^e
14 días	107.255 (1.477) ^{a,b}	91.294 (2.114) ^d	100.925 (1.299) ^c	75.670 (0.716) ^f
21 días	100.577 (0.830) ^c	81.538 (1.256) ^e	102.942 (0.789) ^{b,c}	74.985 (1.432) ^f

Los valores representan medias del número de monocitos-macrófagos/ mm² ± SEM; ^{a,b,c,d,e,f} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas (P<0.05).

El número de monocitos – macrófagos en cuartos mamarios no infectados fue significativamente mayor (P<0.05) en cuartos tratados con MRB, con recuento de células similares en los tres periodos de la involución estudiados. Por otra parte, en cuartos mamarios no infectados tratados con placebo, se observó un aumento significativo (P<0.05) en el número de monocitos – macrófagos al día 7 del secado (Figura 11).

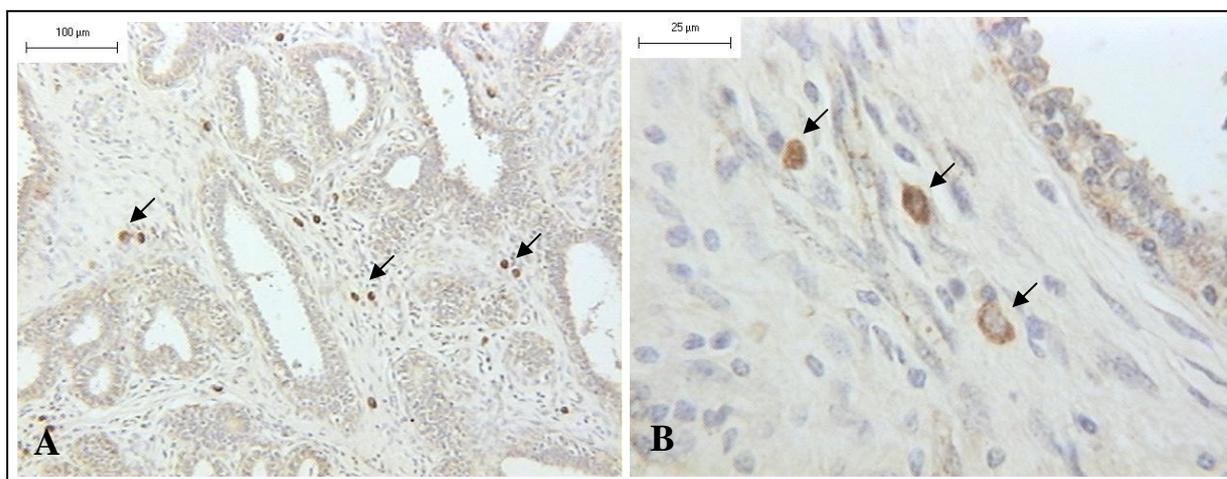


Figura 11: Inmunomarcación con anti CD14 en glándula mamaria no infectada tratada con MRB a los 7 días del secado. A: Las flechas indican monocitos – macrófagos reactivos a la inmunomarcación. B: Las flechas indican monocitos - macrófagos con marcación intensa (3+) en sus citoplasmas.

En cuartos infectados, tratados con MRB, el número de monocitos – macrófagos al día 7 y 14 del secado fue significativamente mayor al observado al día 21 (P<0.05) (Figura 12). En cuartos infectados, tratados con placebo, el número de células positivas a la inmunomarcación

con CD14 fue significativamente mayor al día 7 del secado ($P<0.05$) disminuyendo con el progreso de la involución.

El número de monocitos – macrófagos fue significativamente mayor ($P<0.05$) en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* que en no infectados tratados con placebo, en todos los periodos de la involución evaluados.

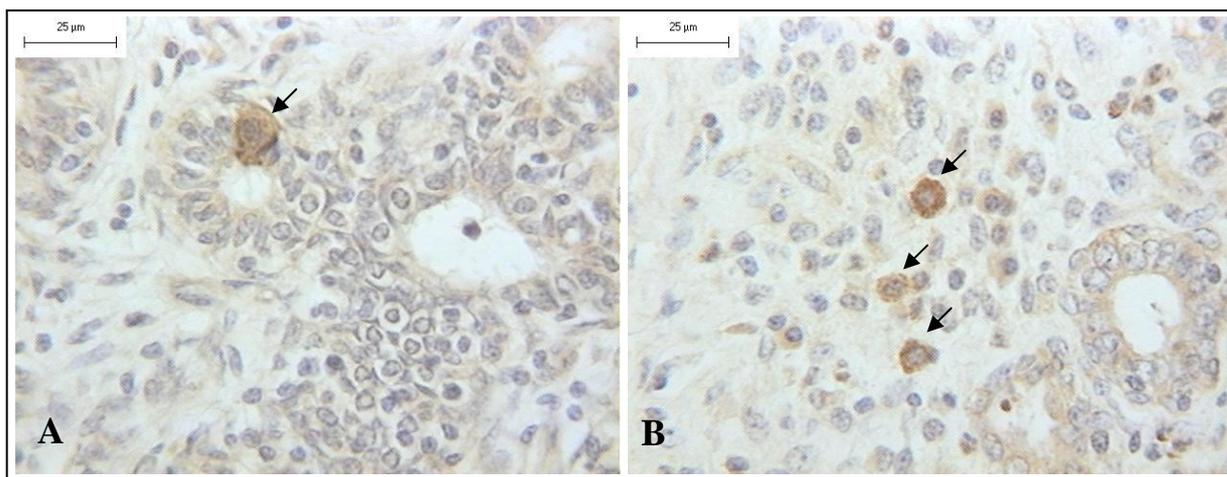


Figura 12: Inmunomarcación con anti CD14 en glándula mamaria infectada con *S. aureus* tratada con MRB a los 21 días del secado. A y B: Las flechas indican monocitos - macrófagos con marcación intensa (3+) en sus citoplasmas.

4.6. Análisis morfométrico

Los efectos del tratamiento con MRB o placebo sobre el área ocupada por estroma en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados se observan en la tabla 12.

El porcentaje de área ocupada por estroma en cuartos no infectados, tratados con MRB o placebo, se incrementó significativamente del día 7 al 21 del secado ($P<0.05$); sin embargo no fueron detectadas diferencias entre los tratados con MRB y placebo para cada tiempo de muestreo.

El porcentaje de área ocupada por estroma en cuartos mamarios infectados con *S. aureus*, tratados con placebo, no mostró diferencias entre los periodos de la involución estudiados. Sin embargo, el área ocupada por estroma al día 7 del secado en cuartos tratados con MRB, fue significativamente menor ($P<0.05$) que el observado en los demás periodos y con los diferentes tratamientos ($39.968\pm 4.311\%$).

Tabla 12: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el estroma mamario en cuartos no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	39.968 (4.311) ^a	56.416 (7.594) ^{b,c}	57.918 (3.069) ^{b,c}	55.214 (7.030) ^b
14 días	74.748 (2.482) ^d	70.097 (4.084) ^{c,d}	66.253 (3.568) ^{b,c,d}	66.538 (3.641) ^{b,c,d}
21 días	68.576 (2.894) ^{b,c,d}	68.715 (3.306) ^{b,c,d}	72.584 (2.227) ^d	73.096 (2.513) ^d

Los valores representan medias expresadas como porcentajes de área ocupada por estroma \pm SEM; Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.7. Proliferación celular

4.7.1. PCNA

La proliferación de las células epiteliales mamarias evaluada con PCNA se muestra en la tabla 13.

Tabla 13: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre la expresión de PCNA en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	33.682(1.071) ^a	34.423(1.388) ^a	23.063(0.501) ^{c,d}	19.946(0.795) ^e
14 días	30.945(1.002) ^b	29.017(0.524) ^b	21.057(0.981) ^{d,e}	23.163(0.486) ^{c,d}
21 días	28.335(0.483) ^b	29.797(1.090) ^b	23.161(0.789) ^{c,d}	23.980(0.585) ^c

Los valores representan medias expresadas como porcentajes de marcación con PCNA \pm SEM; ^{a,b,c,d,e} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuartos mamarios no infectados, tratados con MRB, la proliferación celular fue similar en los diferentes periodos estudiados. Sin embargo, el porcentaje de proliferación fue menor al día 7 del secado en los cuartos tratados con placebo ($P < 0.05$) y se incrementó a través del período de observación para alcanzar valores similares a los de los cuartos tratados con MRB al día 14 y 21 (Figura 13).

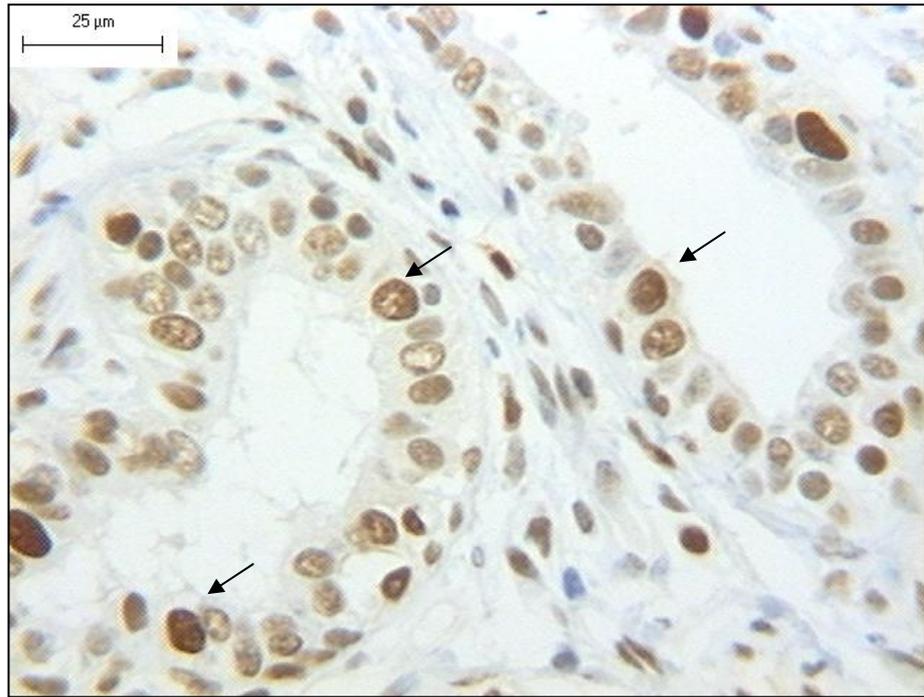


Figura 13: Inmunomarcación con PCNA en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con placebo, a los 7 días de la involución. Las flechas indican células PCNA intensamente positivas (3+).

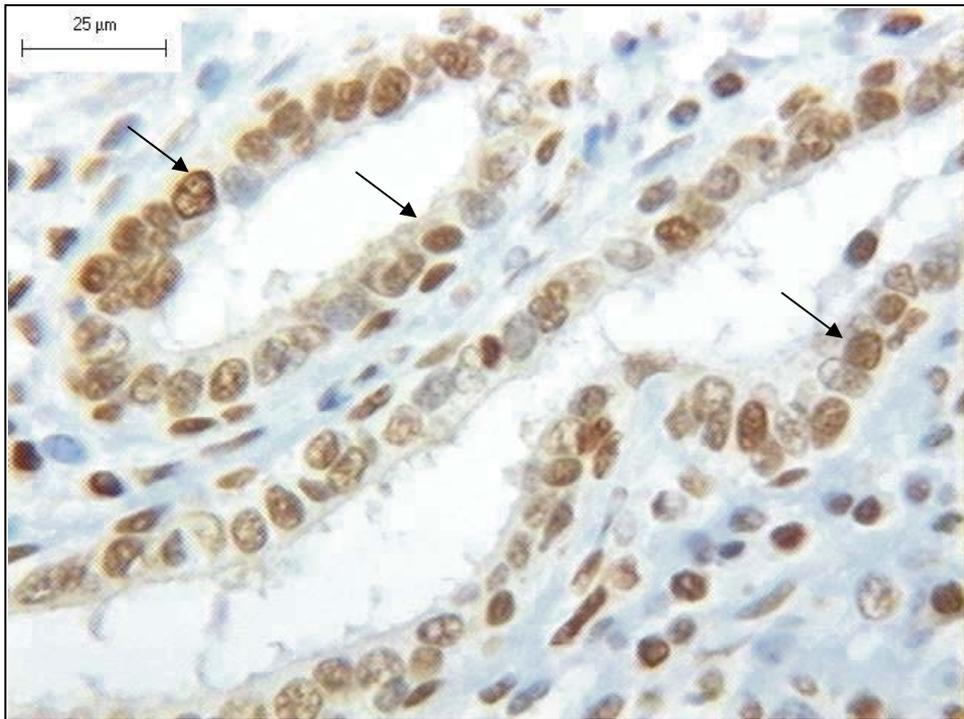


Figura 14: Inmunomarcación para PCNA en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*, tratada con placebo a los 7 días del secado. Las flechas indican células PCNA intensamente positivas (3+).

Los porcentajes de proliferación en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* fueron mayores al día 7 del secado en cuartos tratados con MRB y placebo ($P < 0.05$), disminuyendo a través de los períodos de observación.

Los porcentajes de proliferación fueron mayores en cuartos infectados que en no infectados en todos los periodos estudiados independientemente del tratamiento recibido ($P < 0.05$) (Figuras 14 y 15).



Figura 15: Inmunomarcación para PCNA en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*, tratada con MRB, a los 21 días del secado. Las flechas indican células PCNA intensamente positivas (3+). (#) Eosinófilos en el interior del alvéolo mamario no reactivos a PCNA.

4.7.2. Ki-67

Los porcentajes de proliferación de las células epiteliales y del estroma mamario en cuartos infectados con *S. aureus* fueron evaluados con el anticuerpo Ki-67 y se detallan en la tabla 14.

La proliferación de las células epiteliales fue mayor al día 7 del secado en cuartos tratados con MRB y placebo ($P < 0.05$), disminuyendo a través de los periodos de observación evaluados. Los porcentajes de proliferación de las células del estroma fueron similares a los de las células epiteliales con un máximo al día 7 del secado en tratados con MRB y en controles. A los 14 y 21 días del secado los porcentajes de proliferación de las células epiteliales y estromales fueron similares en los tratados con MRB y placebo (Figura 16).

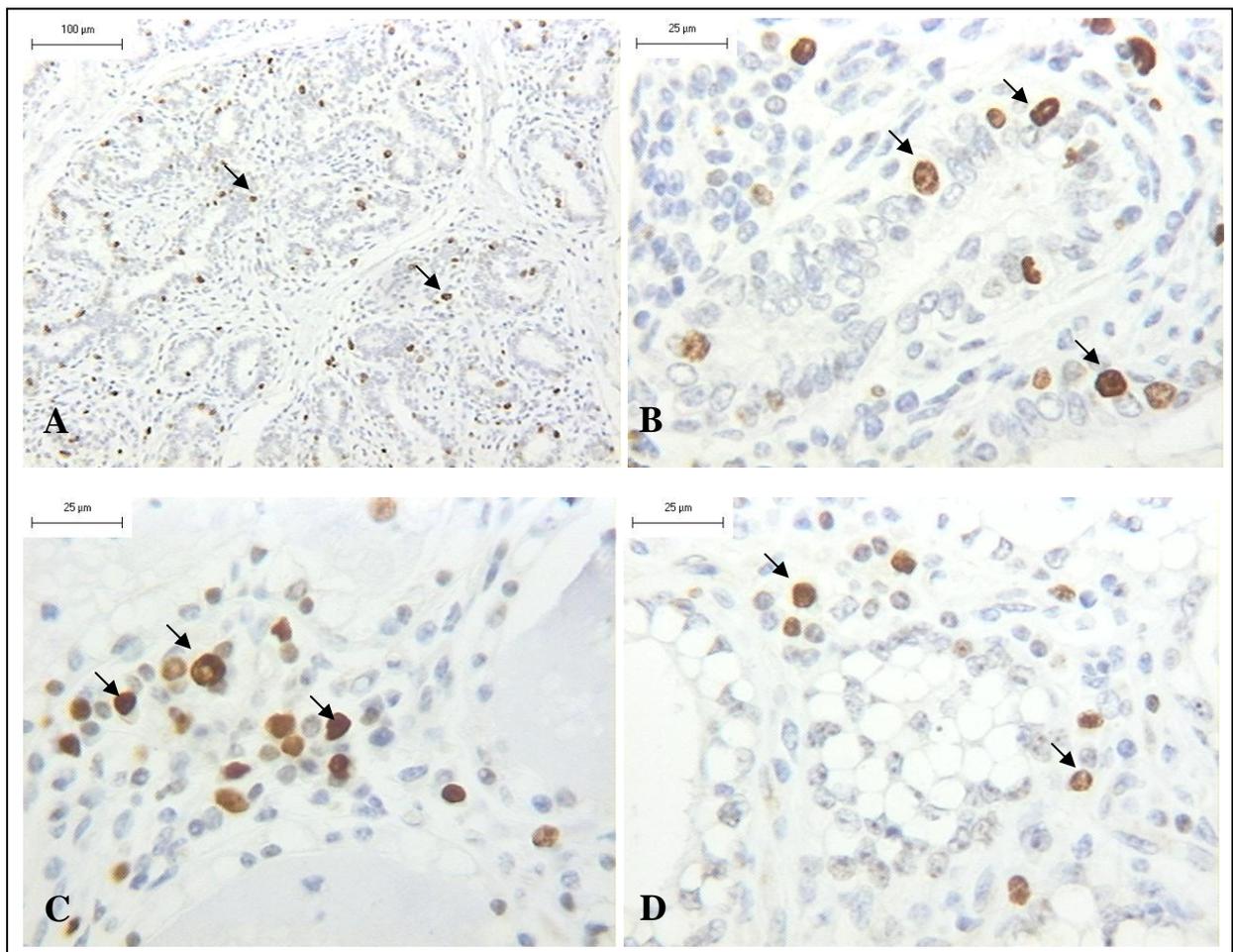


Figura 16: Inmunomarcación para Ki-67 en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* tratados con MRB o placebo durante la involución. A y B: 7 días del secado tratados con MRB. Las flechas indican células epiteliales positivas a la inmunomarcación. C: 7 días del secado tratados con MRB. Las flechas indican células del estroma con marcación positiva. D: 14 días del secado tratados con placebo. Las flechas indican células del estroma con marcación positiva.

Tabla 14: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre la expresión de Ki-67 en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Epitelio		Estroma	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	4.899 (0.313) ^a	4.519 (0.574) ^a	6.123 (2.211) ^a	4.289 (0.421) ^{a,b}
14 días	3.327 (0.139) ^b	3.136 (0.042) ^b	2.515 (0.214) ^b	2.461 (0.216) ^b
21 días	3.277 (0.163) ^b	2.567 (0.116) ^b	2.648 (0.377) ^b	2.271 (0.511) ^b

Los valores representan medias expresadas como porcentajes de marcación con Ki-67 \pm SEM; ^{a,b} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.8. Patrón de localización de los factores de crecimiento en glándula mamaria

La reacción de marcación inmunopositiva para cada proteína evaluada (IGF-I, VEGF y TNF- α) fue detectada por la coloración marrón del citoplasma y evaluada por análisis de segmentación de colores. Para cada factor de crecimiento se calculó el porcentaje de área inmunomarcada. Diferencias regionales en la distribución y área de inmunomarcación para cada factor de crecimiento fueron observadas dentro de la glándula mamaria. Los efectos del tratamiento sobre los porcentajes de área inmunomarcadas para IGF-I, VEGF y TNF- α en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados se visualizan en las tablas 15, 16 y 17.

4.8.1 Inmunomarcación para IGF-I

La inmunomarcación para IGF-I fue observada en todos los períodos estudiados en cuartos infectados y no infectados variando de débil a intensa, principalmente asociada con estructuras del parénquima mamario. Cuartos mamarios infectados y no infectados tratados con MRB y placebo mostraron inmunomarcación intensa en el epitelio de conductos y alvéolos. En cuartos con IIM arterias y venas mostraron reacción intensa en el endotelio, células musculares lisas y contenido (Figura 17). En contraste, en cuartos no infectados la marcación de IGF-I varió de débil a moderada en las mismas estructuras. En los tres estadios de la involución estudiados y con los diferentes tratamientos se observaron con frecuencia macrófagos en el lumen de los alvéolos y en el estroma, mostrando reacción intensa a la

marcación con IGF-I. El tejido conectivo del estroma intralobulillar e interlobulillar fue negativo a la inmunomarcación.

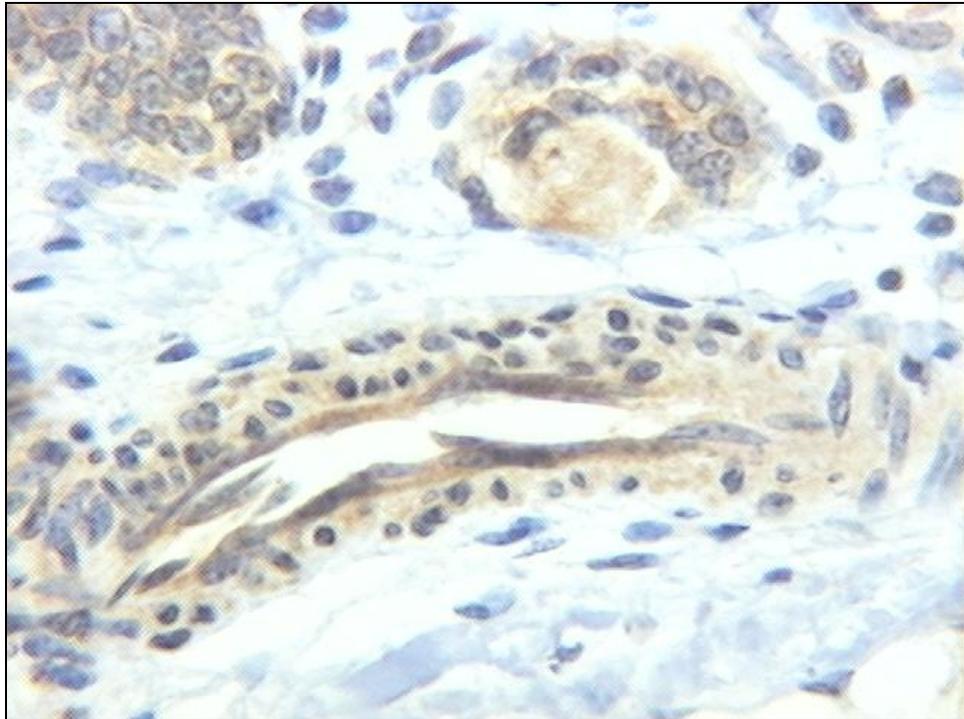


Figura 17: Inmunomarcación para IGF-I en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus* tratada con MRB a los 14 días de la involución. Se observa marcación intensa (3+) en el endotelio y fibras musculares lisas en una arteriola. El tejido conectivo interlobulillar no reaccionó a la inmunomarcación.

La expresión de IGF-I en cuartos no infectados mostró similar marcación para tratados con placebo y MRB, mostrando una disminución significativa al día 21 comparado con el día 14 y 7 del secado ($P < 0.05$) (Figura 18). La marcación de IGF-I en cuartos infectados tratados con MRB se incrementó de manera significativa ($P < 0.05$) desde el día 14 del secado, en cambio cuartos tratados con placebo los mayores porcentajes de área inmunomarcada se observaron al día 7 y 14 del secado para luego disminuir en forma significativa al día 21 ($P < 0.05$) (Figura 29).

La expresión de IGF-I fue mayor en cuartos mamarios infectados que en no infectados en todos los periodos estudiados independientemente del tratamiento recibido.

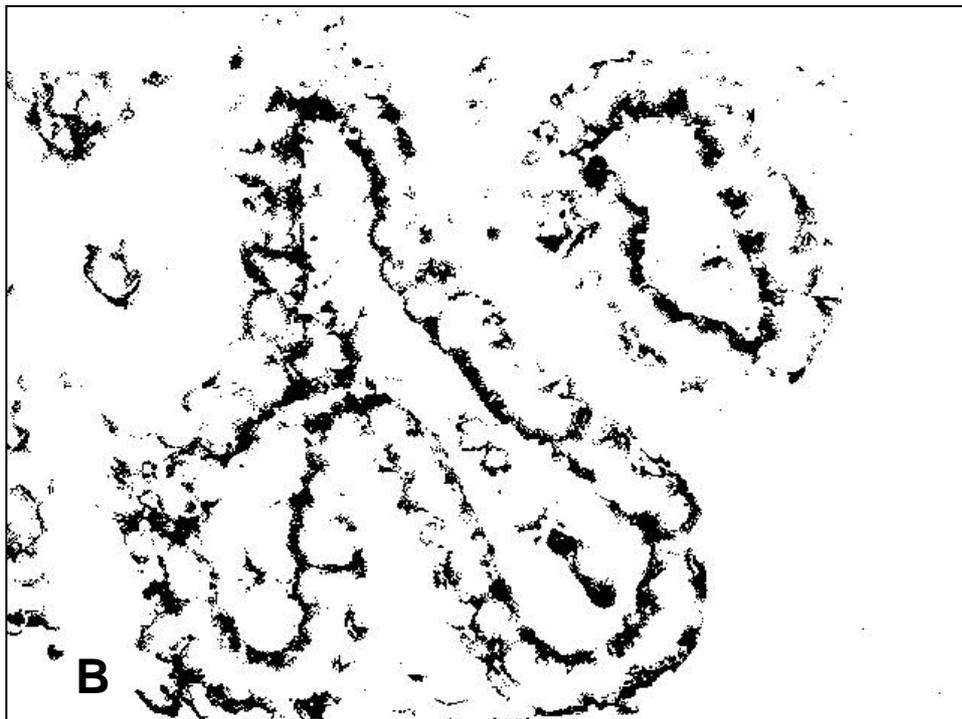
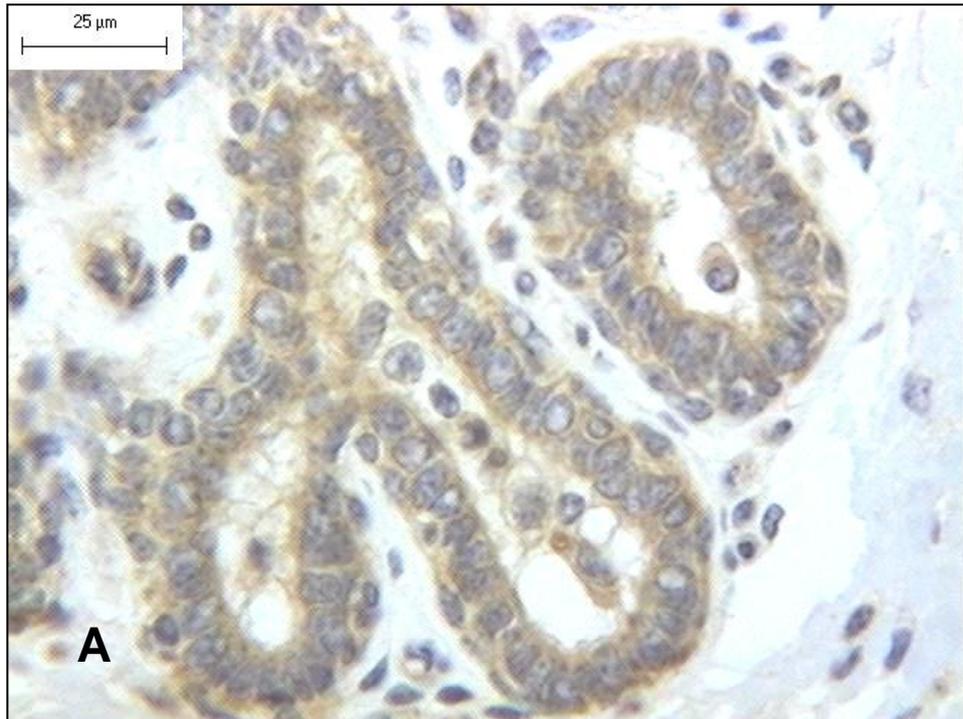


Figura 18: Inmunomarcación para IGF-I en glándula mamaria bovina no infectada tratada con placebo a los 14 días de la involución. A) Reacción intensa a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales alveolares. B) Máscara de la inmunomarcación.

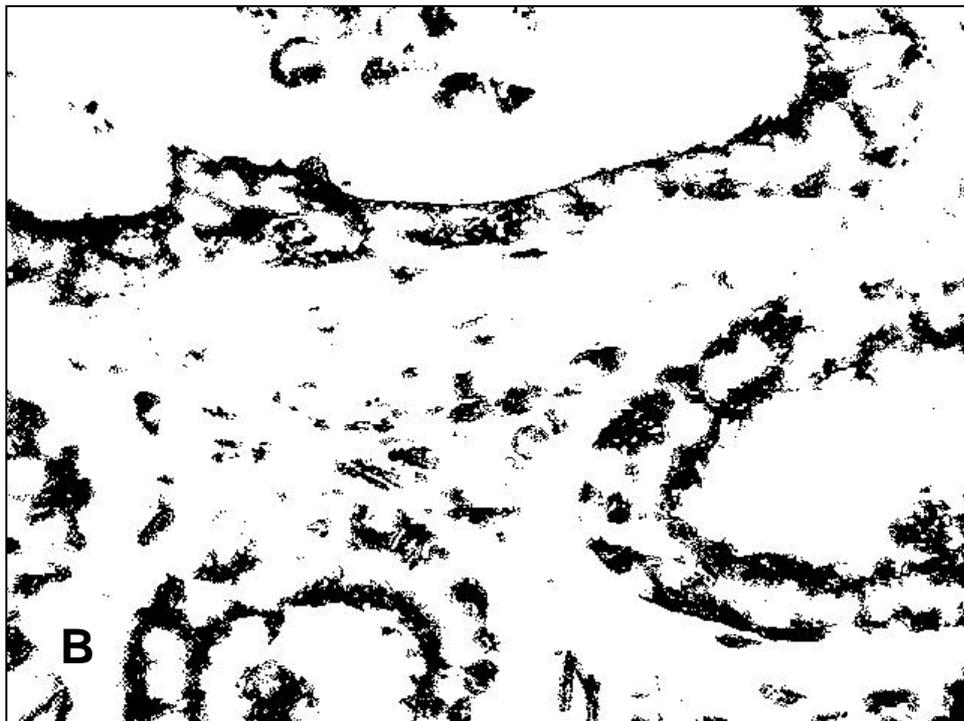
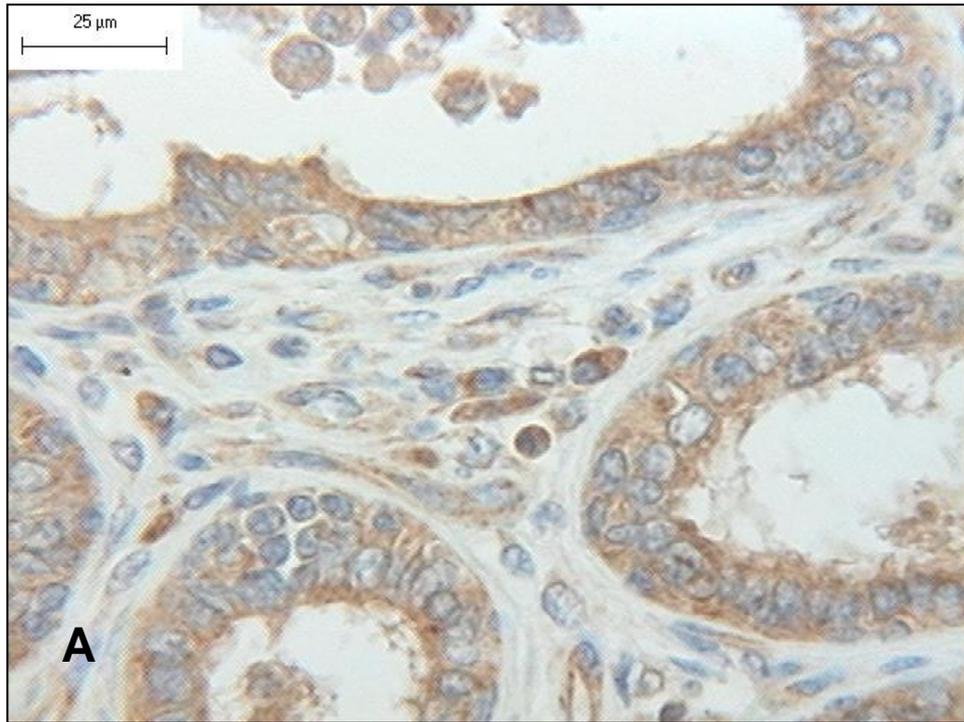


Figura 19: Inmunomarcación para IGF-I en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus* tratada con MRB a los 14 días de la involución. A) Reacción intensa a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales alveolares. B) Máscara de la inmunomarcación.

Tabla 15: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de área inmunomarcada para IGF-I en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	12.472(0.192) ^{b,c}	14.009(0.246) ^{a,b}	8.597(0.231) ^d	8.179(0.323) ^{d,e}
14 días	15.626(0.763) ^a	15.03(0.879) ^a	7.076(0.661) ^{d,e,f}	8.291(0.320) ^{d,e}
21 días	14.468(0.909) ^a	11.707(0.828) ^c	6.538(0.649) ^{e,f}	5.408(0.553) ^f

Los valores representan medias de los porcentajes de área inmunomarcada \pm SEM; ^{a,b,c,d,e,f} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.8.2. Inmunomarcación para VEGF

La localización celular específica del VEGF fue similar en cuartos mamarios infectados y no infectados durante la involución. La expresión de este factor de crecimiento se asoció primariamente con el epitelio de conductos y alvéolos del parénquima mamario mostrando reacción intensa a la inmunomarcación. Los vasos sanguíneos mostraron marcación en los endotelios y fibras musculares lisas. Los macrófagos en el lumen de los alvéolos y en el estroma mostraron reacción intensa a la marcación en el citoplasma. El tejido conectivo intralobulillar e interlobulillar no reaccionó a la marcación con VEGF.

El porcentaje de área inmunomarcada en cuartos no infectados tratados con MRB fue mayor al día 7 ($P < 0.05$) del secado y luego decreció en los demás periodos estudiados (Figura 20). Entretanto, la expresión de VEGF en cuartos no infectados tratados con placebo, no mostró diferencias en los diferentes estadios estudiados. Diferencias entre tratados con MRB y placebo fueron significativas al día 7 de la involución ($P < 0.05$).

En cuartos infectados, el porcentaje de área inmunomarcada mostró diferencias entre los cuartos tratados con placebo y MRB. Sin embargo en el grupo tratado con placebo, la expresión de VEGF fue mayor al día 7 ($P < 0.05$), para disminuir luego al día 14 y 21. En el grupo tratado con MRB, la menor expresión de VEGF se observó al día 7 para aumentar significativamente al día 14 y 21 de la involución ($P < 0.05$) (Figura 21).

La expresión de VEGF fue mayor en cuartos mamarios infectados que en no infectados en todos los periodos estudiados independientemente del tratamiento recibido.

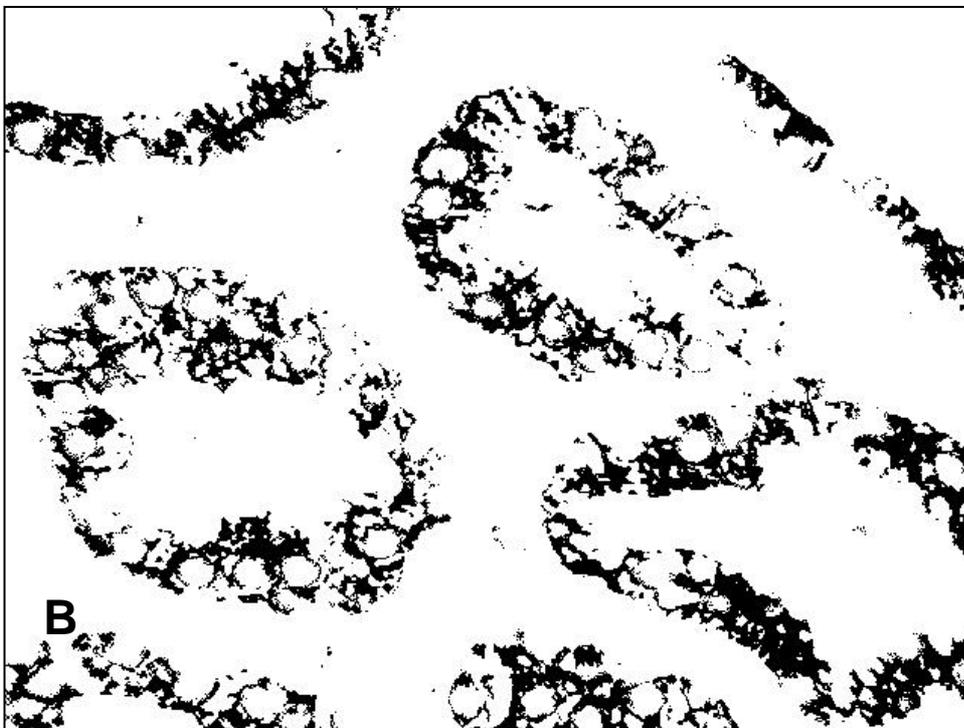
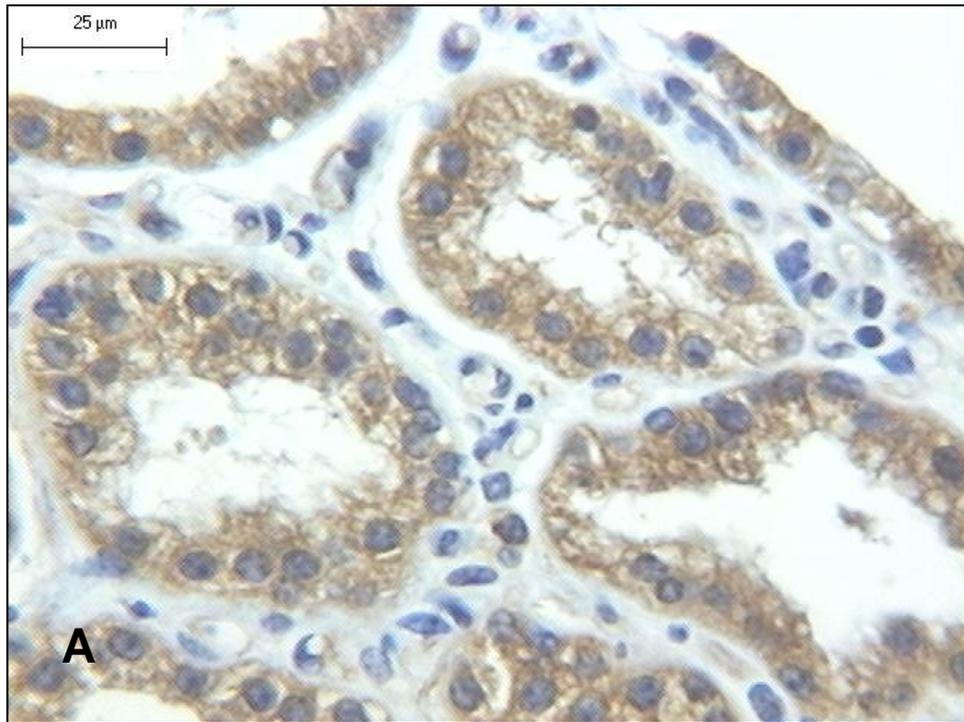


Figura 20: Inmunomarcación para VEGF en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con MRB, a los 7 días del secado. A) Reacción intensa a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales alveolares. B) Máscara de la inmunomarcación.

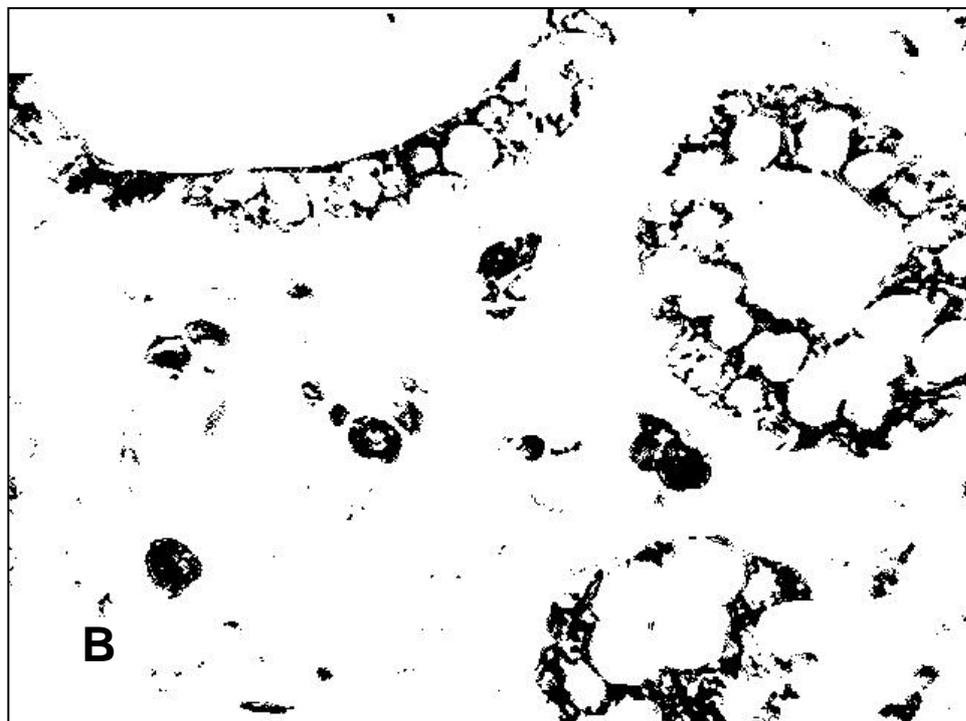
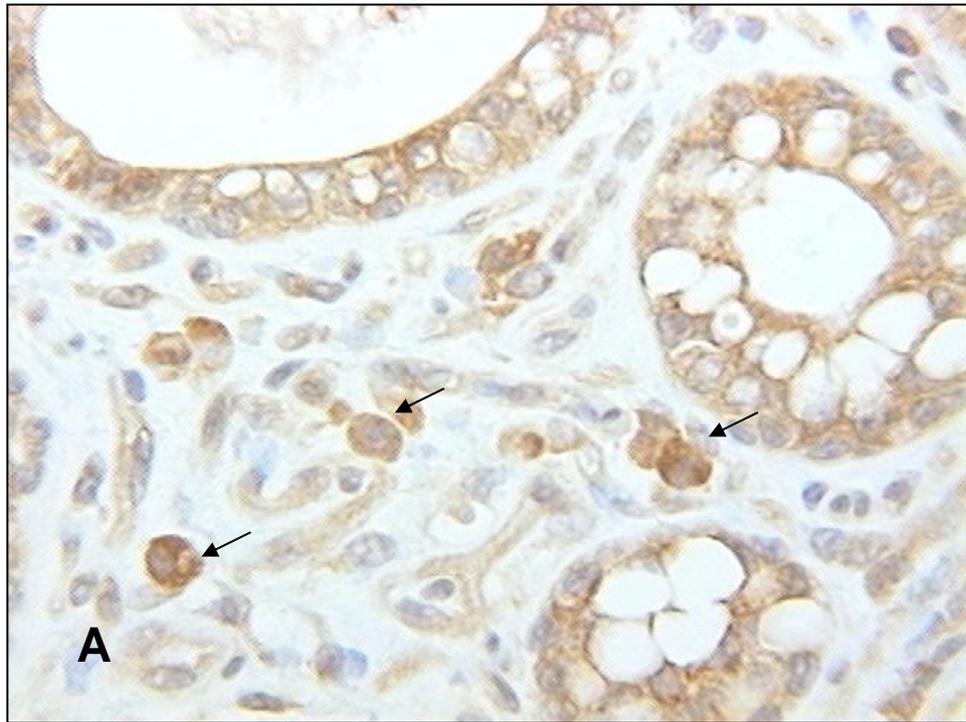


Figura 21: Inmunomarcación para VEGF en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*, tratada con MRB, a los 7 días del secado. A) Reacción intensa (3+) a la inmunomarcación en el citoplasma de las células epiteliales alveolares y en el citoplasma de macrófagos (flechas). B) Máscara de la inmunomarcación.

Tabla 16: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de área inmunomarcada para VEGF en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	11.271 (0.246) ^{c,d}	14.063 (0.403) ^a	13.301 (0.696) ^{a,b}	9.190 (0.382) ^{e,f}
14 días	12.890 (0.223) ^{a,b}	12.332 (0.625) ^{b,c}	8.592 (0.307) ^f	8.848 (0.311) ^{d,e,f}
21 días	13.725 (0.937) ^{a,b}	10.672 (0.552) ^{d,e}	9.849 (0.399) ^f	9.987 (0.350) ^{d,e,f}

Los valores representan medias de los porcentajes de área inmunomarcada \pm SEM; ^{a,b,c,d,e,f} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.8.3. Inmunomarcación para TNF- α

En tejido mamario infectado con *S. aureus* y no infectado y en todos los periodos de la involución estudiados, la inmunomarcación de TNF- α se asoció a estructuras del parénquima y estroma de la glándula mamaria. Se observó marcación intensa (3+) del citoplasma de las células epiteliales alveolares y de conductos excretores (Figura 22). El citoplasma de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos intraepiteliales reaccionó intensamente a la inmunomarcación al igual que los endotelios y fibras musculares lisas de los vasos sanguíneos (Figuras 23 y 24). El tejido conectivo interalveolar e interlobulillar no reaccionó a la inmunomarcación.

Los resultados del efecto del tratamiento con MRB sobre la expresión de TNF- α en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución se detallan en la tabla 17.

Tabla 17: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de área inmunomarcada para TNF- α en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	11.88 (0.31) ^b	11.11 (0.36) ^{b,c}	7.22 (0.73) ^{e,f}	8.55 (0.45) ^{d,e}
14 días	9.75 (0.74) ^{c,d}	8.71 (0.57) ^{d,e}	4.90 (0.79) ^g	5.84 (0.46) ^{f,g}
21 días	17.20 (0.50) ^a	12.28 (0.61) ^b	8.20 (0.42) ^{d,e}	8.81 (0.44) ^{d,e}

Los valores representan medias de los porcentajes de área inmunomarcada \pm SEM; ^{a,b,c,d,e,f} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

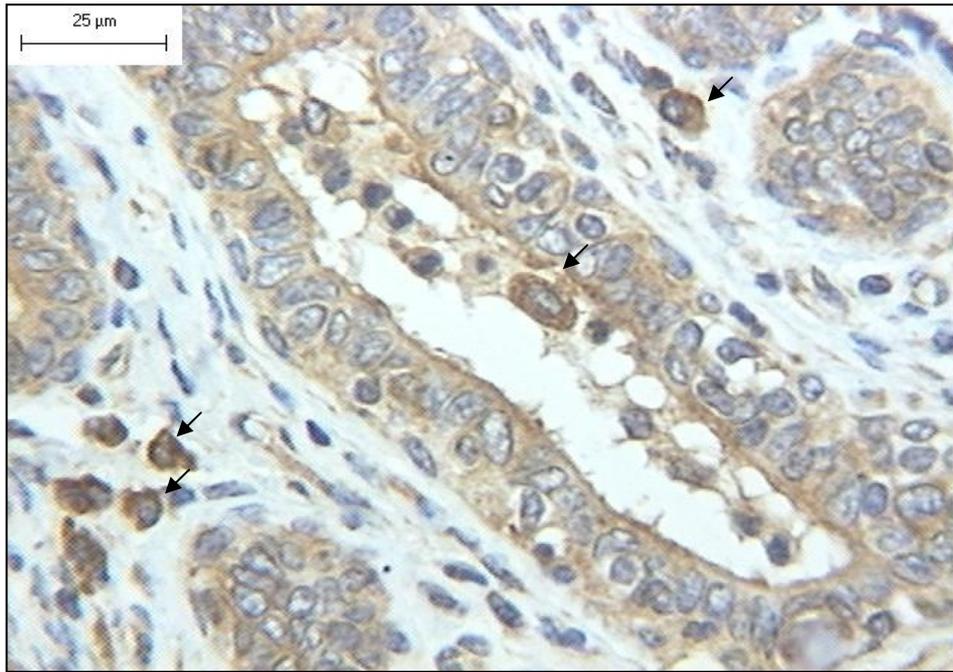


Figura 22: Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus* tratada con MRB a los 21 días del secado. Marcación intensa (3+) del citoplasma de las células epiteliales que tapizan los alvéolos y conductos mamarios. Marcación intensa (3+) del citoplasma de macrófagos (flechas).

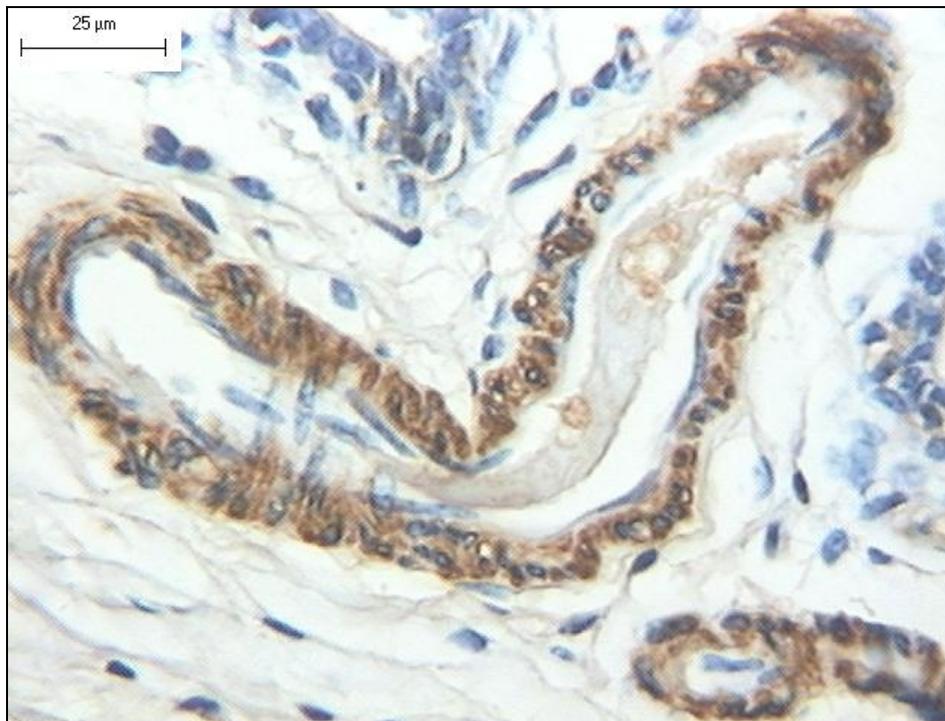


Figura 23: Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con MRB, a los 7 días de la involución. Marcación intensa (3+) de las fibras musculares lisas de la pared de una arteriola.

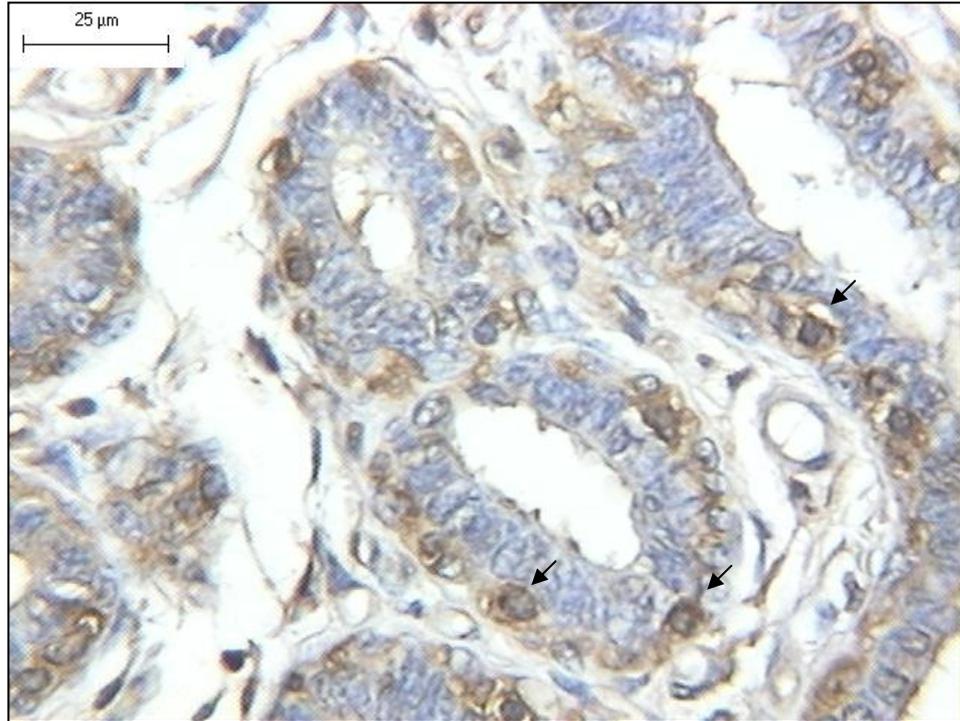


Figura 24: Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus* tratada con placebo a los 21 días del secado. Marcación intensa (3+) del citoplasma de linfocitos intraepiteliales (flechas).

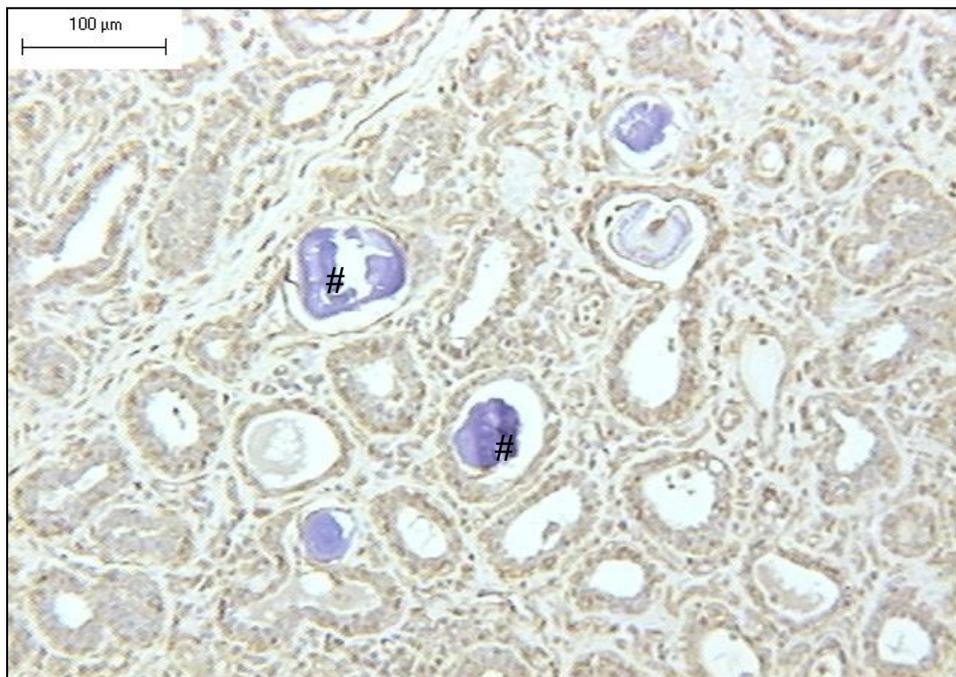


Figura 25: Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria no infectada tratada con MRB a los 7 días del secado. Cuerpos amiloides no reactivos a la inmunomarcación en el interior de los alvéolos (#).

En cuartos mamarios no infectados no se observaron diferencias en los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α entre los tratados con MRB y placebo ($P < 0.05$) en los diferentes periodos evaluados. A los 7 y 21 días del secado, en los tratados con MRB y placebo, los porcentajes de marcación fueron significativamente mayores que los hallados al día 14 ($P < 0.05$) (Figuras 25 y 26).

En cuartos mamarios infectados con *S. aureus* los porcentajes de área inmunomarcada fueron similares en tratados con MRB y placebo, sólo al día 21 del secado se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) en la marcación para TNF- α en los tratados con MRB.

Los porcentajes de marcación para TNF- α fueron mayores en cuartos mamarios infectados que en no infectados en todos los periodos estudiados independientemente del tratamiento recibido.

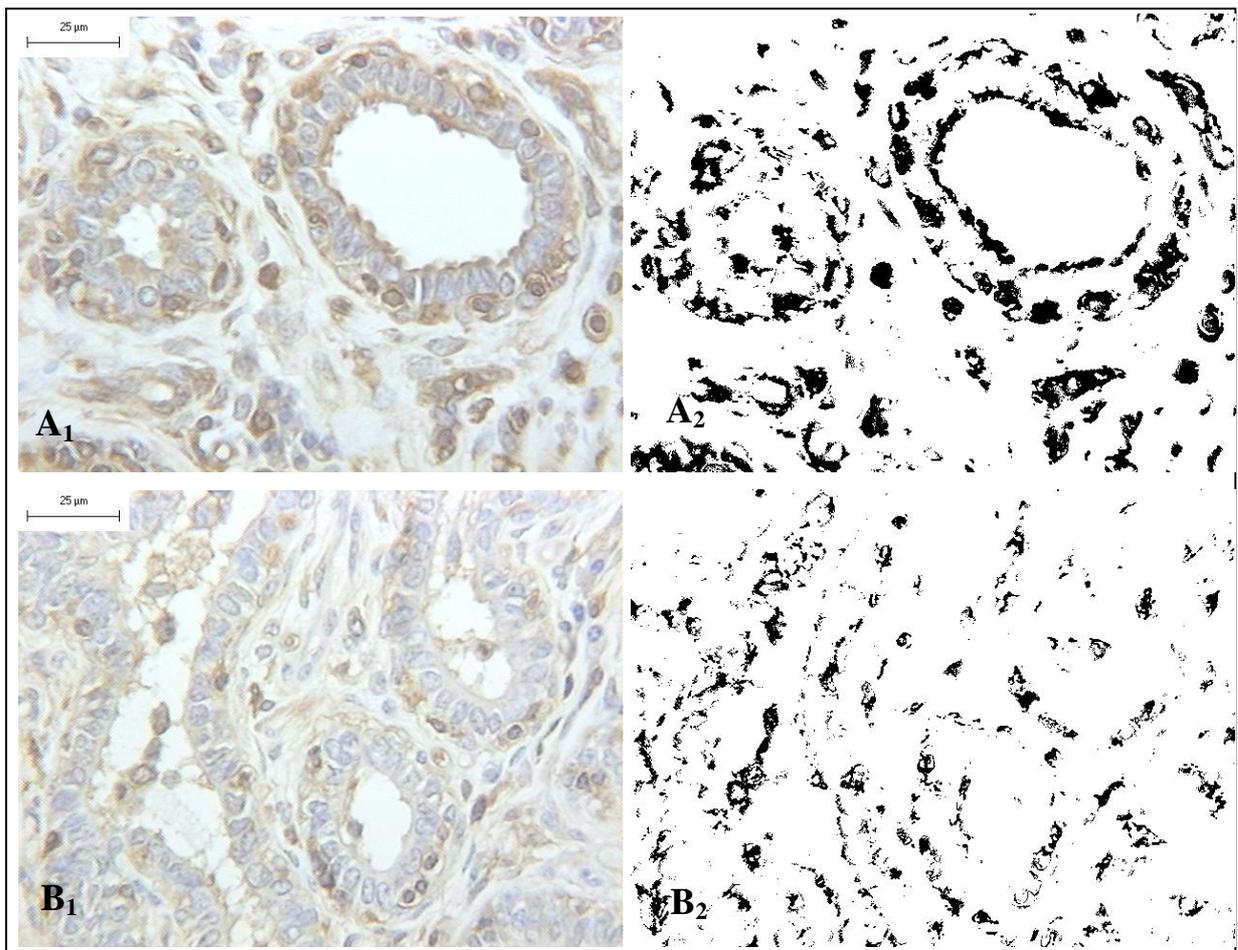


Figura 26: Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria no infectada, tratada con placebo. A₁: a los 7 días del secado, A₂: máscara de la inmunomarcación. B₁: a los 14 días del secado, B₂: máscara de la inmunomarcación.

4.9. Caracterización de la apoptosis

4.9.1. Inmunomarcación para Bax

Los efectos del tratamiento en los porcentajes de áreas inmunomarcadas para Bax en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados se visualizan en la tabla 18.

En cuartos mamarios no infectados, tratados con placebo, se observó mayor expresión de Bax a los 14 y 21 días de la involución, difiriendo significativamente con los porcentajes hallados al día 7 del secado ($P < 0.05$) (Figura 27). En cuartos tratados con MRB, no se observaron diferencias entre los periodos de la involución evaluados y los porcentajes de inmunomarcación para Bax fueron similares a los hallados en los cuartos inoculados con placebo.

En cuartos mamarios infectados con *S. aureus*, el tratamiento con MRB produjo un incremento significativo en los porcentajes de marcación para Bax durante todos los estadios de la involución evaluados ($P < 0.05$). Los mayores porcentajes de área inmunomarcada para Bax en cuartos infectados tratados con placebo se observaron a partir del día 14 del secado (Figuras 28 y 29). Por otra parte, en los cuartos infectados tratados con placebo, los porcentajes de áreas inmunomarcadas fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) a los hallados en cuartos no infectados tratados con placebo en todos los periodos de la involución estudiados.

Los porcentajes de área inmunomarcada para Bax fueron significativamente mayores en cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* que en cuartos sanos, en todos los periodos evaluados independientemente del tratamiento recibido ($P < 0.05$).

Tabla 18: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de área inmunomarcada para Bax en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	4.504 (0.216) ^b	2.105 (0.220) ^d	1.405 (0.361) ^{d,e}	0.999 (0.282) ^e
14 días	4.794 (0.114) ^{a,b}	3.531 (0.282) ^c	1.682 (0.347) ^{d,e}	2.082 (0.089) ^d
21 días	5.400 (0.341) ^a	3.717 (0.313) ^c	1.797 (0.081) ^{d,e}	2.248 (0.539) ^d

Los valores representan medias de los porcentajes de área inmunomarcada \pm SEM; ^{a,b,c,d,e} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

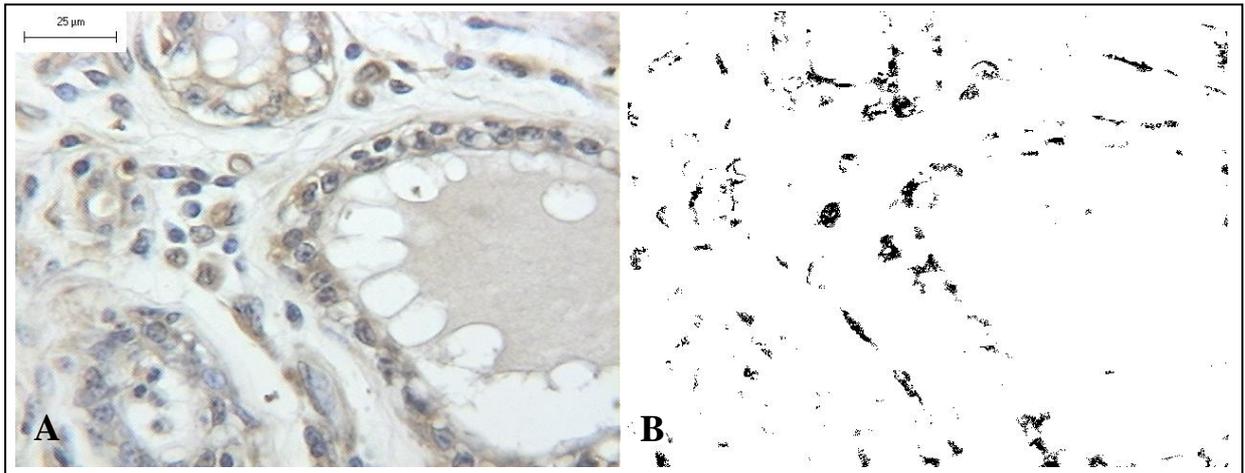


Figura 27: A: Inmunomarcación para Bax en glándula mamaria bovina no infectada, tratada con placebo, a los 14 días del secado. B: Máscara de la inmunomarcación.

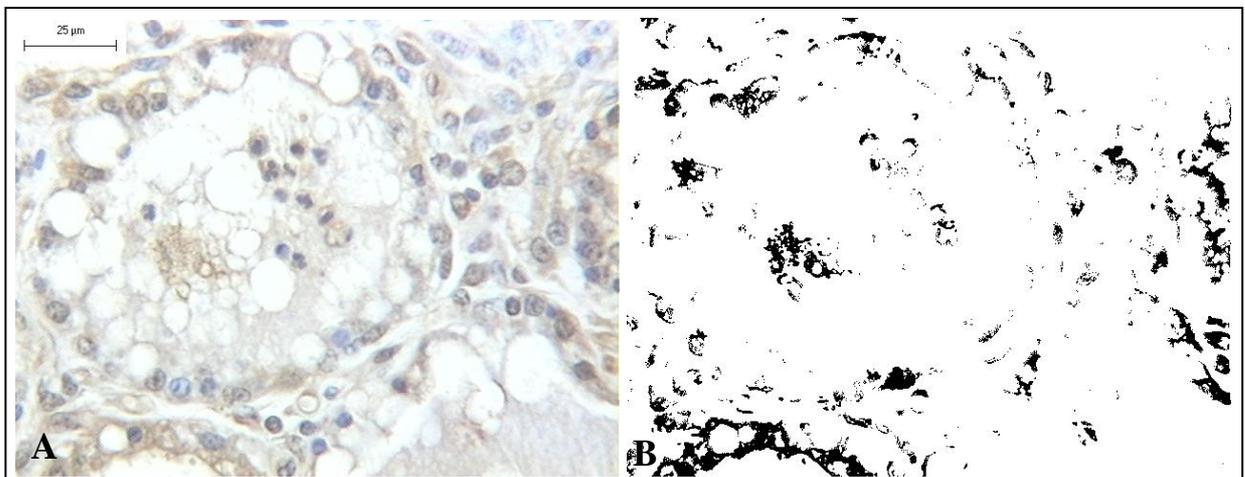


Figura 28: A: Inmunomarcación para Bax en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*, tratada con placebo, a los 7 días del secado. B: Máscara de la inmunomarcación.

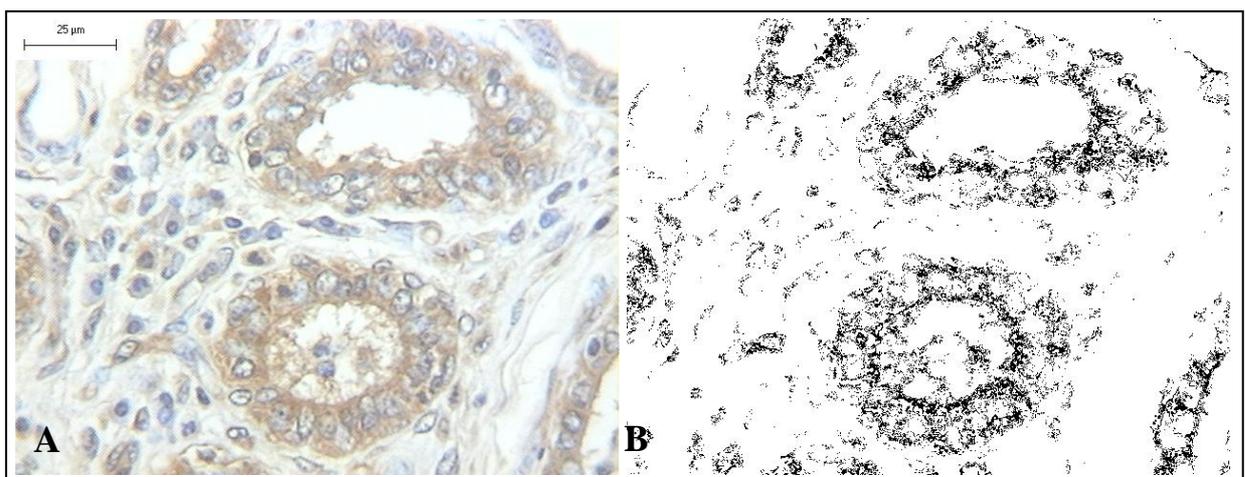


Figura 29: A: Inmunomarcación para Bax en glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*, tratada con MRB, a los 21 días del secado. B: Máscara de la inmunomarcación.

4.9.2. Inmunomarcación para caspasa-3 activa:

Los resultados del efecto del tratamiento con MRB sobre los porcentajes de células inmunomarcadas con caspasa-3 activa en tejido mamario infectado con *S. aureus* y no infectado durante la involución se detallan en las tablas 19 y 20.

Tabla 19: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de células epiteliales inmunomarcadas con caspasa-3 activa en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	3.894 (0.175) ^a	1.682 (0.105) ^{e,f}	2.643 (0.047) ^{b,c}	2.039 (0.125) ^{d,e}
14 días	2.867 (0.059) ^b	2.398 (0.088) ^{cd}	2.409 (0.163) ^{c,d}	2.567 (0.140) ^{b,c}
21 días	2.911 (0.125) ^b	2.306 (0.094) ^{c,d}	2.278 (0.088) ^{c,d}	2.524 (0.230) ^{b,c}

Los valores representan medias de los porcentajes de células inmunomarcadas \pm SEM; ^{a,b,c,d,e,f} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuartos mamarios no infectados el tratamiento con MRB produjo un aumento significativo en los porcentajes de células epiteliales inmunomarcadas con caspasa-3 activa al día 7 del secado, en relación a los controles tratados con placebo ($P < 0.05$). En los restantes periodos de la involución estudiados no se observaron diferencias entre tratados con MRB y placebo.

En cuartos mamarios infectados con *S. aureus* tratados con MRB los porcentajes de células epiteliales marcadas con caspasa-3 activa fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) a los hallados en los cuartos tratados con placebo en los tres estadios de la involución estudiados. El mayor efecto de la inoculación de MRB sobre los porcentajes de células epiteliales inmunomarcadas se observó al día 7 del secado en cuartos infectados, hallándose diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a los controles tratados con placebo (Figura 30 C).

En cuartos mamarios no infectados el tratamiento con MRB produjo un incremento significativo de la marcación con caspasa-3 activa de las células estromales en todos los estadios de la involución estudiados ($P < 0.05$). En cuartos no infectados tratados con placebo, los porcentajes de células reactivas aumentaron con el progreso de la involución (Figuras 30 A y B).

En cuartos infectados con *S. aureus* el tratamiento con MRB produjo un incremento la inmunomarcación de las células estromales en todos los estadios evaluados, observándose los

mayores porcentajes al día 7 del secado (Figura 30 D). En cuartos infectados tratados con placebo, los porcentajes de marcación de las células estromales al día 21 del secado fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) a los valores hallados al día 7 y 14.

Tabla 20: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de células estromales inmunomarcadas con caspasa-3 activa en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	6.438 (0.486) ^a	4.102 (0.107) ^d	5.221 (0.183) ^{b,c}	2.778 (0.104) ^e
14 días	5.547 (0.266) ^b	4.292 (0.248) ^d	5.648 (0.103) ^b	3.288 (0.179) ^e
21 días	5.539 (0.232) ^b	5.442 (0.186) ^b	5.503 (0.211) ^b	4.338 (0.170) ^d

Los valores representan medias de los porcentajes de células inmunomarcadas \pm SEM; ^{a,b,c,d,e} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

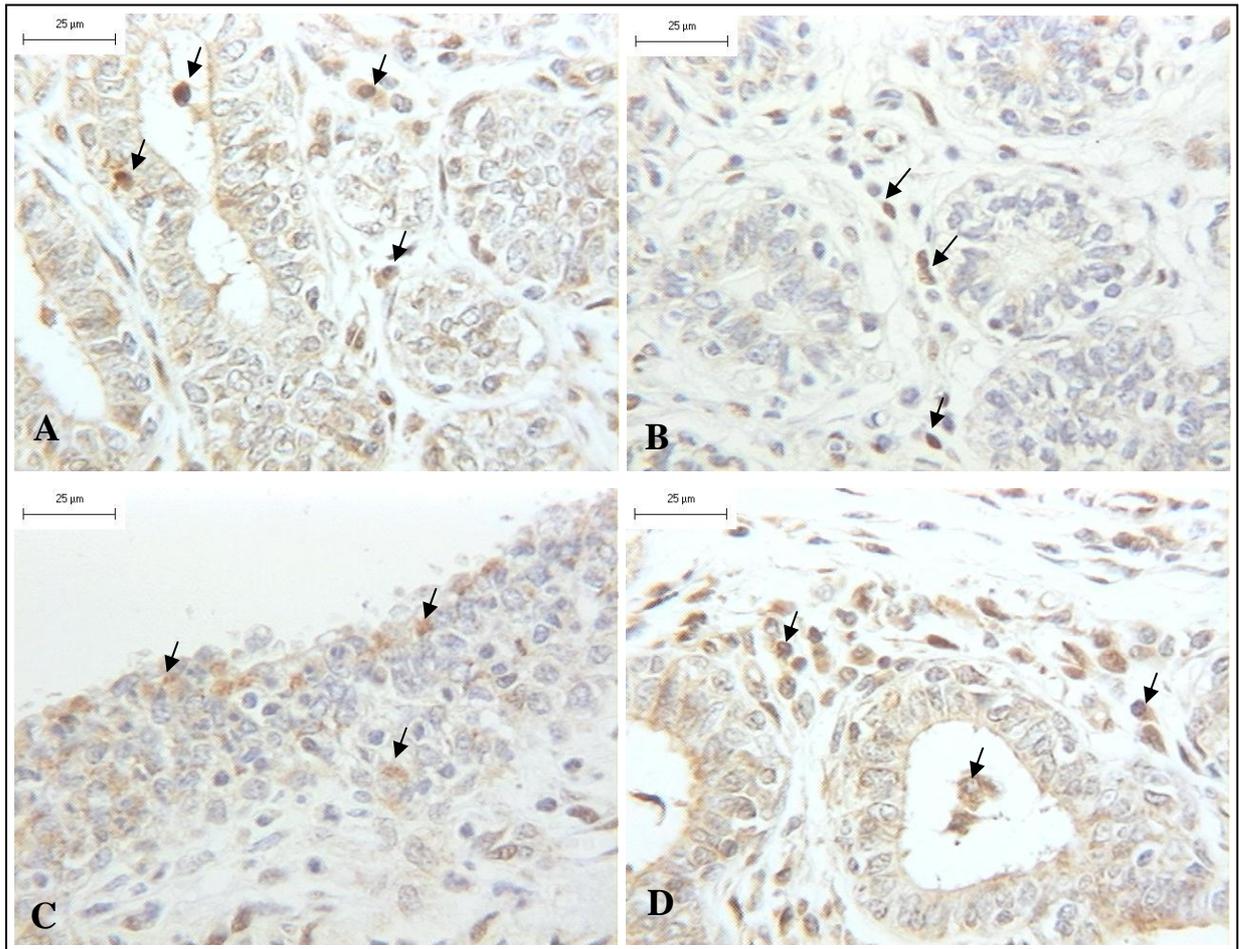


Figura 30: Inmunomarcación para caspasa-3 activa en glándula mamaria bovina durante la involución. A: Cuarto mamario no infectado tratado con MRB a los 14 días del secado. B: cuarto mamario no infectado tratado con placebo a los 21 días del secado. C y D: Cuarto mamario infectado con *S. aureus* tratado con MRB a los 7 días del secado. Las flechas indican células epiteliales y estromales reactivas a la inmunomarcación con caspasa-3 activa.

4.9.3. Detección de apoptosis *in situ*

La detección de células apoptóticas *in situ* se realizó utilizando la técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*).

Los resultados del efecto del tratamiento con MRB sobre los porcentajes de células apoptóticas en tejido mamario infectado con *S. aureus* y no infectado durante la involución se detallan en las tablas 21 y 22.

Tabla 21: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de apoptosis de células epiteliales en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	2.443 (0.204) ^a	1.597 (0.033) ^{c,d}	1.171 (0.010) ^{e,f}	1.466 (0.084) ^{c,d,e}
14 días	1.823 (0.091) ^{b,c}	1.236 (0.108) ^{d,e,f}	1.076 (0.032) ^f	1.604 (0.257) ^{c,d}
21 días	2.063 (0.144) ^b	2.019 (0.020) ^b	1.041 (0.048) ^f	1.593 (0.046) ^{c,d}

Los valores representan medias de los porcentajes de células apoptóticas \pm SEM; ^{a,b,c,d,e,f} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuartos mamarios no infectados, el tratamiento con MRB, disminuyó en forma significativa ($P < 0.05$) los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales a partir del día 14 de la involución con respecto a los controles tratados con placebo (Figura 31 A). En cuartos mamarios no infectados, tratados con placebo, los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales fueron similares en los tres periodos de la involución evaluados.

El tratamiento con MRB en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* modificó los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales con un aumento de la muerte celular programada a los 7 y 14 días del secado, observándose diferencias significativas ($P < 0.05$) con los controles tratados con placebo (Figura 31 B). Al día 21 del secado, los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales en tratados con con MRB y placebo fueron similares.

Tabla 22: Efecto del tratamiento con un modificador de la respuesta biológica (MRB) sobre el porcentaje de apoptosis en células estromales en cuartos mamarios no infectados e infectados con *S. aureus* durante la involución.

Días de involución	Cuartos infectados con <i>S. aureus</i>		Cuartos no infectados	
	MRB	PLACEBO	MRB	PLACEBO
7 días	2.618 (0.104) ^b	1.044 (0.057) ^f	1.968 (0.086) ^c	0.953 (0.050) ^f
14 días	2.731 (0.105) ^{a,b}	1.120 (0.086) ^{e,f}	1.994 (0.040) ^c	1.338 (0.142) ^{d,e}
21 días	2.883 (0.039) ^a	1.958 (0.010) ^c	2.009 (0.090) ^c	1.450 (0.043) ^d

Los valores representan medias de los porcentajes de células apoptóticas \pm SEM; ^{a,b,c,d,e,f} Diferentes letras para cada tratamiento y días de involución indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

El tratamiento con MRB en cuartos mamarios no infectados incrementó los porcentajes de apoptosis de las células estromales en forma significativa en todos los periodos de la involución estudiados ($P < 0.05$) con respecto a los controles tratados con placebo (Figura 31 C). En los cuartos no infectados tratados con placebo, los porcentajes de células apoptóticas estromales se incrementaron en forma significativa ($P < 0.05$) a partir del día 14 del secado (Figura 31 D).

El tratamiento con MRB en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* incrementó en forma significativa ($P < 0.05$) los porcentajes de apoptosis de las células estromales, con respecto a los controles tratados con placebo, en todos los estadios de la involución estudiados (Figura 31 E). En los cuartos no infectados tratados con placebo, los porcentajes de células apoptóticas estromales se incrementaron en forma significativa ($P < 0.05$) a partir del día 21 del secado (Figura 31 F).

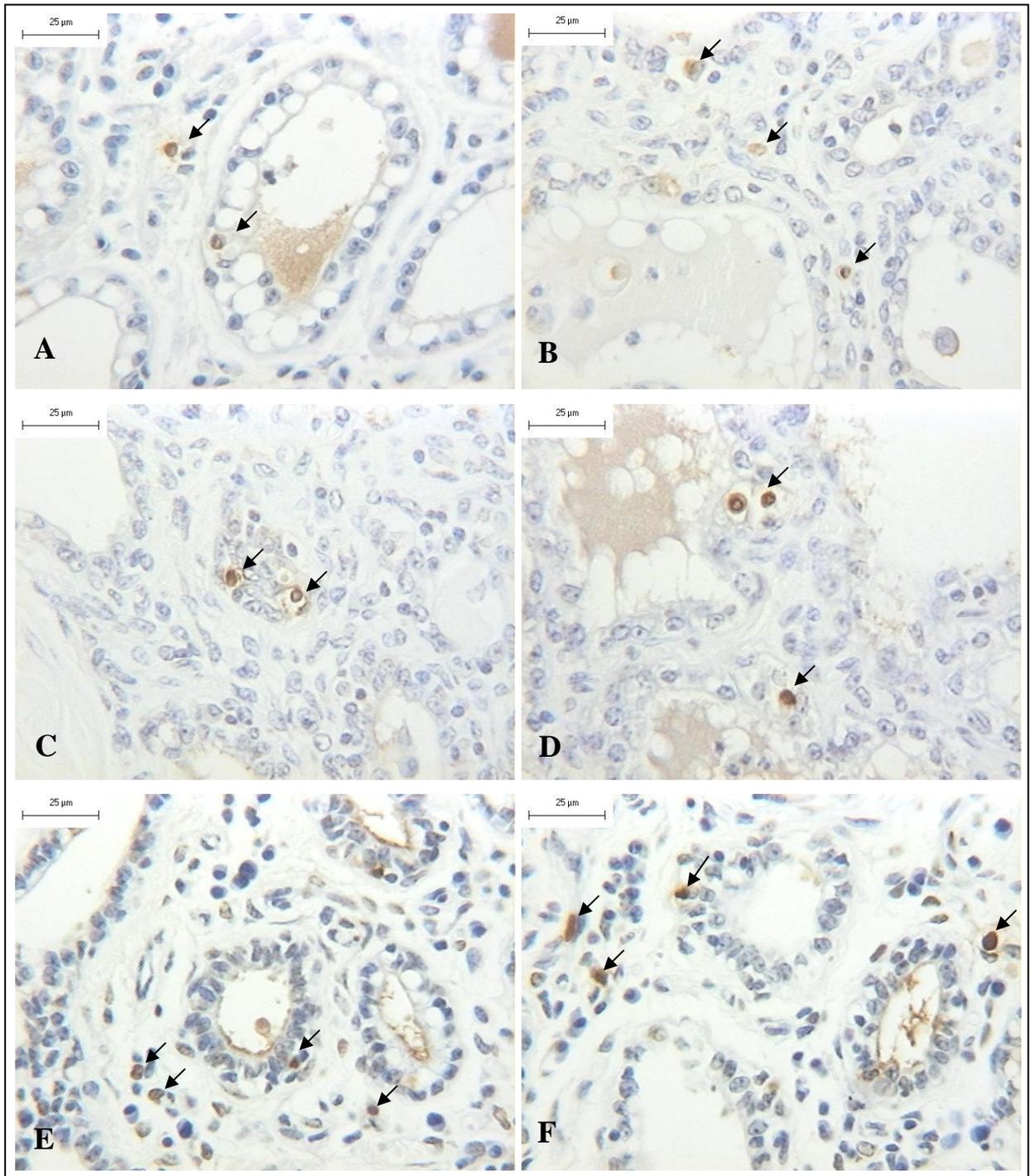


Figura 31: Localización de apoptosis en glándula mamaria bovina durante la involución (técnica de TUNEL). A: Cuarto mamario no infectado, tratado con MRB, a los 14 días del secado. B: Cuarto mamario infectado con *S. aureus*, tratado con MRB, a los 14 días del secado. C: Cuarto mamario infectado con *S. aureus*, tratado con MRB, a los 7 días del secado. D: Cuarto mamario infectado con *S. aureus*, tratado con placebo, a los 14 días del secado. E: Cuarto mamario infectado con *S. aureus*, tratado con MRB, a los 21 días del secado. F: Cuarto mamario infectado con *S. aureus*, tratado con placebo a los 21 días del secado. Las flechas indican células TUNEL (+) en el epitelio y estroma de la glándula mamaria.

5. DISCUSIÓN

5.1. Ensayo dosis respuesta.

El MRB a la dosis usada en el presente estudio se mostró seguro para los animales, causando solo inflamación leve. En adición, la presencia de un solo pico de temperatura en las vacas inoculadas con MRB coincide con lo observado previamente luego de la administración intramamaria de endotoxinas (Burvenich *y col.*, 1983; Lengemann y Pitzrick, 1986). El patrón de RCS a través del tiempo en cuartos no tratados fue similar a los parámetros previamente observados en vacas luego de la interrupción de la lactancia (Jensen y Eberhart, 1981; Oliver y Smith, 1982a); mostrando un incremento sostenido a lo largo del periodo de muestreo con un pico a los 7 días PI. El RCS en cuartos tratados con MRB mostró diferencias entre los dos grupos y entre cuartos no tratados con un pico a las 24 hs PI. Un patrón cronológico similar fue observado luego de una única administración intramamaria de 100 µg de LPS de *E. coli* o 100 µg de LPS de *E. coli* adicionado con 20 mg de colchicina al final de la lactancia (Oliver y Smith, 1982a) y 100 µg de LPS de *E. coli* en la lactancia tardía (Lehtolainen *y col.*, 2003).

La naturaleza diferente de las preparaciones utilizadas en los estudios previos (Oliver y Smith, 1982a) no permite la realización de comparaciones directas; sin embargo, un influjo masivo de células tuvo lugar al mismo tiempo PI y fue seguido de un patrón similar de declinación a lo largo del periodo experimental. A la inversa, Nickerson *y col.* (1992) administrando infusiones intramamarias diarias de 100µg de LPS de *E. coli* durante 21 días en el periodo no lactante, no encontraron aumentos significativos del RCS a intervalos semanales. Las diferencias halladas entre estudios podrían estar dadas por la naturaleza de los compuestos utilizados y por la estimulación repetida durante la involución de la glándula.

En el presente ensayo, en los dos grupos tratados con diferentes dosis de MRB, se observó un patrón similar en el RCS, aunque no fue evidente un efecto dosis dependiente. Esto podría deberse a las pequeñas diferencias en la concentración de LPS entre las dosis seleccionadas, lo cual concuerda con estudios previos donde no se detectaron diferencias significativas en la respuesta del RCS luego de la inoculación intramamaria de dos dosis de LPS de *E. coli*, 1 o 10 µg, en glándulas mamarias de cabras (Lengemann y Pitzrick, 1986).

5.2. Efecto del MRB sobre el estado infeccioso de la glándula mamaria.

LPS de *E. coli* han sido extensamente utilizados para estudiar los mecanismos que tienen lugar durante el proceso inflamatorio, y menos frecuentemente como estimulantes no específicos de las defensas durante la involución mamaria (Oliver y Smith, 1982a; Nickerson y col., 1992). En el presente estudio, fueron determinados los efectos de la aplicación de un MRB a base de LPS de *E. coli* y fracciones membranosas y ribosomales incorporadas en liposomas, administrado al final de la lactancia en glándulas mamarias libres de IIM e infectadas crónicamente con *S. aureus*. La incorporación del LPS bacteriano en liposomas, reduce parcialmente sus actividades biológicas, lo que disminuye sus efectos tóxicos potenciales (Erridge y col., 2002). Además, los liposomas funcionan entregando antígenos asociados a macrófagos, que son las células blanco para el LPS (Alving, 1993; Erridge y col., 2002a,b).

Los mecanismos por los cuales la incorporación de LPS en liposomas modifican la interacción con el sistema inmune innato no están totalmente aclarados. Se ha demostrado que los receptores CD14 unidos a membrana y TLR (*Toll-like receptors*)-4, están involucrados en la activación a través de LPS de células mononucleares y esta activación puede ser incrementada por proteínas solubles unidas a LPS (Akira y Hemmi, 2003; Erridge y col., 2002b). Un estudio reciente mostró que la unión de fosfolípidos a LPS soluble inhibe la producción de TNF- α inducida por LPS por las células mononucleares lo cual lleva a interferir con la presentación de LPS a las proteínas de unión (Mueller y col., 2005). Los fosfolípidos incluidos en liposomas pueden, por consiguiente, reducir la potencia de LPS para estimular a las células inmunes (Mueller y col., 2005). La dosis del MRB utilizada en el presente estudio, mostró ser segura para los animales causando solo leve inflamación de la glándula mamaria y ningún efecto sistémico adverso.

La infusión intramamaria de MRB disminuyó la proporción de cuartos infectados con *S. aureus* a los 7 días de la involución. Sin embargo, una proporción similar de cuartos infectados fue observada al día 14 y 21 de la involución. Estudios anteriores demostraron una frecuencia de aislamientos de Staphylococci coagulasa positivos similar durante la primera semana de la involución en cuartos mamarios tratados con colchicina, endotoxina o con una combinación de ambos compuestos comparados con controles no tratados (Oliver y Smith, 1982b). Además, estudios recientes mostraron que la infusión intramamaria de granulocito macrófago-factor estimulante de colonias recombinante bovino (rboGM-CSF) e interleuquina-8 recombinante bovina (RbIL-8) en la lactancia media en vacas con infecciones

recientes o crónicas por *S. aureus*, causó una disminución del número de microorganismos aislados de secreciones mamarias dentro de los dos días PI. Sin embargo, los cuartos permanecieron infectados y el número de *S. aureus* en secreción mamaria aumentó después de esto (Takahashi *y col.*, 2004).

Los MRB a base de LPS son reconocidos por monocitos y macrófagos, los cuales reaccionan liberando una gama de mediadores proinflamatorios, que en el sitio de infección y en niveles moderados benefician la respuesta inflamatoria e inmune del hospedador (Erridge *y col.*, 2002a). La evaluación de la eficacia del MRB utilizado para eliminar las IIM fue más allá del alcance de este estudio. Sin embargo, el efecto sobre el aislamiento bacteriano logrado en este experimento luego de la administración de MRB, mostró ser de corto tiempo e insuficiente para eliminar infecciones crónicas. Futuras investigaciones serán necesarias para evaluar el efecto del compuesto utilizado en este experimento y otros similares en infecciones recientes.

5.3. Efectos del MRB sobre la morfología de glándula mamaria durante la involución.

Estudios anteriores demostraron que, el porcentaje de área compuesta por epitelio y lumen en tejido glandular mamario bovino disminuye durante la involución, mientras que el porcentaje de área ocupada por estroma aumenta alcanzando un pico entre los 14 y 25 días luego de la interrupción de la lactancia (Sordillo y Nickerson, 1988; Capuco *y col.*, 1997). En el presente estudio, el área ocupada por estroma no se vio afectada por el tratamiento con MRB en cuartos no infectados, sin embargo, al día 7 del periodo de secado en cuartos crónicamente infectados con *S. aureus*, el porcentaje de estroma mostró una disminución significativa. En contraste con los resultados del presente estudio realizados durante la involución, estudios morfológicos realizados en cuartos mamarios de hembras bovinas vírgenes de aproximadamente 18 meses de edad e infectadas con *S. aureus*, demostraron que el porcentaje de estroma se incrementó indicando mayor síntesis de elementos estromales (Quiroga y Nickerson, 1993). Esta diferencia podría deberse a que en el estudio descripto, utilizaron vacas vírgenes y las infecciones fueron inducidas. La presente investigación fue realizada durante la involución en cuartos mamarios con infecciones crónicas por *S. aureus*.

Nickerson *y col.* (1992) luego de la administración diaria de 100 µg de LPS durante 21 días en vacas no lactantes, encontraron que el porcentaje de área ocupada por alvéolos no se vio afectada, sin embargo, el porcentaje de luces alveolares y estroma se incrementó. Estos

resultados indicaron que el LPS bacteriano aceleraba el proceso de involución. En el presente estudio, los resultados sugieren que la administración intramamaria del MRB a base de LPS bacteriano utilizado al final de la lactancia en cuartos libres de IIM, no afecta el porcentaje de área estromal, no interfiriendo en el proceso de involución; mientras que, en cuartos crónicamente infectados produciría un retraso en el mismo solo detectado al día 7 del secado. Estos resultados sugieren, que el MRB a la dosis utilizada en este experimento, tuvo solo un efecto transitorio en la morfología del tejido glandular en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* sin afectar la arquitectura del mismo.

5.4. Efectos del MRB sobre el número de células infiltrantes

Estudios previos mostraron que el área estromal subepitelial es el sitio más común de infiltración leucocitaria durante la involución de la glándula mamaria bovina (Sordillo y Nickerson, 1988). En el presente estudio, en cuartos mamarios infectados crónicamente con *S. aureus* durante la involución, el número de mastocitos, eosinófilos y monocitos-macrófagos/mm² fue significativamente mayor al hallado en cuartos no infectados, independientemente del tratamiento recibido.

La infiltración de mastocitos en el estroma subepitelial de la glándula mamaria bovina disminuye gradualmente luego de la interrupción de la lactancia alcanzando bajos recuentos al momento del parto (Sordillo y col., 1988). En el presente estudio, el número de mastocitos/mm² en cuartos no infectados tratados con placebo se incrementó con el progreso de la involución alcanzándose el mayor valor a los 21 días del secado. Además, el tratamiento con MRB no modificó el número de mastocitos cuantificados en los diferentes periodos estudiados, obteniéndose resultados similares a los hallados en los controles. El rol de este tipo celular durante la involución en la glándula mamaria no está completamente entendido, y existe escasa información disponible a cerca de la importancia de estas células en tejido mamario bovino.

Durante dos décadas, estudios *in vitro* e *in vivo* han ligado a la activación y degranulación de los mastocitos con la angiogénesis y neovascularización (Folkman 1982, Levi-Schaffer y Pe'er, 2001, Norrby, 2002). Esta hipótesis ha sido parcialmente sostenida por la estrecha asociación anatómica entre los mastocitos y los vasos sanguíneos, y por el reclutamiento de estas células durante el crecimiento tumoral, curación de las heridas e inflamación (Benítez-Bribiesca y col., 2001; Fukushima y col., 2001; Norrby, 2002). Además, la degranulación de

los mastocitos por una variedad de secretagogos causa la liberación de potentes factores angiogénicos, como VEGF, bFGF y varias IL como IL-1 e IL-6 (Burd *y col.*, 1989; Selvan *y col.*, 1994).

Estudios tempranos dirigidos a determinar el posible rol de los mastocitos en los cambios patológicos observados durante la IIM por *Streptococcus agalactiae* no fueron concluyentes (Zarkower y Norcross, 1966). En el presente estudio, el tratamiento con MRB, en cuartos crónicamente infectados con *S. aureus*, produjo un aumento significativo en el número de mastocitos en todos los periodos evaluados que se incrementó con el progreso de la involución. Este aumento en el número de mastocitos/mm² durante el secado fue coincidente con un aumento en el porcentaje de área inmunomarcada para VEGF. Esta asociación sugiere un posible efecto benéfico del MRB sobre el tejido mamario infectado favoreciendo la neovascularización del tejido dañado.

La infiltración de eosinófilos en tejido mamario no es común (Nickerson *y col.*, 1992). Estudios previos reportaron un incremento en la infiltración de eosinófilos en el área estromal subepitelial luego de la administración de IL-2 o *pokeweed mitogen* (PWM) de *Phytolacca americana* en glándula mamaria bovina no lactante (Nickerson *y col.*, 1992) y lactante (Sordillo *y col.*, 1991). Por otra parte, la administración repetida de LPS en cuartos no lactantes, no modificó el número de eosinófilos en el estroma subepitelial (Nickerson *y col.*, 1992). El significado de la infiltración de eosinófilos en la glándula mamaria no está bien esclarecido. Sordillo *y col.* (1991) sugirieron que la presencia incrementada de eosinófilos y neutrófilos podría estar asociada con efectos deletéreos en la estructura y función del tejido mamario causada por la administración de IL-2 exógena. En el presente estudio, se detectó un incremento significativo del número de eosinófilos en cuartos infectados con *S. aureus*, tratados con MRB, a partir del día 14 del secado; mientras que, en cuartos sanos, el incremento de este tipo celular se dio solo al día 7 del secado.

En cuartos sanos tratados con MRB, se observó un mantenimiento de la estructura alveolar lo que sugiere que el tratamiento no produce efectos adversos en la arquitectura del tejido mamario. En cuartos infectados con *S. aureus* se observaron lesiones inflamatorias crónicas, difusas y focales con diferente compromiso del parénquima mamario que se dieron en los tratados con MRB y en los controles; esto hace suponer que las lesiones fueron causadas por el proceso infeccioso y no por el tratamiento.

En glándula mamaria no infectada, el tipo celular predominante en secreciones mamarias (Jensen y Eberhart, 1981) y en el área estromal subepitelial (Sordillo y Nickerson, 1988) es el macrófago. Tatarczuch *y col.*, (1997) realizaron la inmunomarcación de macrófagos en

glándula mamaria de oveja, sugiriendo que los mismos están presentes en grandes números en el lumen alveolar 15 días después del destete forzado. Otros tipos celulares se identificaron en el tejido conjuntivo de la glándula mamaria involucionada, incluyendo mastocitos, células plasmáticas y eosinófilos (Gouon-Evans *y col.*, 2000; Masso-Welch *y col.*, 2000). En concordancia con estos resultados, en el presente estudio, el tipo celular más abundante en número/mm², en cuartos mamarios no infectados tratados con placebo, fue el macrófago.

En la patogénesis bacteriana, los macrófagos pueden facilitar la respuesta inmune innata o adquirida. De forma similar a los neutrófilos, las funciones no específicas de los macrófagos son fagocitar las bacterias y destruirlas con proteasas y especies reactivas de oxígeno. La tasa de fagocitosis de estas células puede incrementarse dramáticamente en presencia de anticuerpos opsonizados contra patógenos particulares (Miller *y col.*, 1988; Magnusson, 1999). Sin embargo, el número de macrófagos mamarios tiende a ser bajo durante la inflamación y poseen bajo número de receptores Fc (Niemiłowski *y col.*, 1988). En este estudio, el número de monocitos-macrófagos/mm² identificados con un anticuerpo anti CD14, en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus*, fue significativamente mayor al hallado en cuartos sanos durante todo el periodo de observación.

El receptor de CD14 es una proteína de 53 kDa que está presente en monocitos y macrófagos humanos y en menor medida en neutrófilos (Landmann *y col.*, 1991). Esta proteína anclada en la membrana facilita el *clearence* de LPS bacterianos previniendo el shock séptico inducido por éste (Lee *y col.*, 2003), además produce una señal de activación en las células epiteliales mamarias para que expresen IL-8 (Wang *y col.*, 2002). Paape *y col.* (1996) demostraron que los CD14 y 18 en neutrófilos humanos y bovinos comparten un determinante antigénico común y han sido identificados como cruciales para el control de las infecciones por bacterias Gram negativas (Anderson y Springer, 1987; Maliszewski y Wright, 1991).

Un incremento en el número de infiltrado mononuclear en glándula mamaria bovina no lactante ha sido observado luego de la administración repetida de LPS, IL-2 y PWM (Nickerson *y col.*, 1992) así como en cuartos naturalmente infectados (Sordillo y Nickerson, 1988). En el presente estudio en cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados, el tratamiento con MRB produjo un incremento significativo en el número de monocitos-macrófagos/mm² en todos los periodos de la involución evaluados indicando un reclutamiento de este tipo celular. Monocitos y macrófagos reconocen el LPS y reaccionan

liberando una gama de mediadores proinflamatorios, los cuales promueven la inflamación y preparación del sistema inmune (Erridge *y col.*, 2002b).

5.5. Efectos del MRB sobre la proliferación celular.

En estudios morfológicos se demostró que la involución mamaria en vacas lecheras tiene lugar con una pérdida menor de células epiteliales (Holst *y col.*, 1987; Sordillo y Nickerson, 1988). En consecuencia, ha sido sugerido que un período no lactante es importante para mejorar el reemplazo de células epiteliales mamarias seniles o envejecidas para la próxima lactancia. Además, las células epiteliales mamarias mostraron un incremento en la incorporación de [³H]timidina durante el periodo no lactante, indicando un aumento de divisiones celulares y por consiguiente un reemplazo de este tipo celular (Capuco *y col.*, 1997).

Estudios previos mostraron que LPS de *E. Coli* y toxina α de *S. aureus* inhibieron la proliferación de células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) *in vitro* (Matthews *y col.*, 1994; Calvino *y col.*, 2001). Por ello, en la presente investigación, fue determinada la proliferación celular con PCNA y Ki-67 para evaluar si la misma variaba con el tratamiento con MRB y con el estado infeccioso de la glándula mamaria. Ninguna diferencia en los porcentajes de marcación para PCNA y Ki-67 fue encontrada entre cuartos infectados tratados con MRB y placebo, lo que indicó que el tratamiento con MRB no modificó la proliferación celular.

Los resultados de la inoculación experimental de vacas lactantes con *E. coli* documentaron claramente una estimulación de la proliferación y apoptosis de las células epiteliales mamarias (Long *y col.*, 2001). Estos autores encontraron que, el número de células epiteliales apoptóticas, determinado por la técnica de TUNEL, se incrementó de 1.8 ± 0.5 a 8.8 ± 2.8 células. Asimismo, también observaron un aumento en los porcentajes de proliferación de células epiteliales, estromales y luminales; posiblemente debido a un mecanismo restaurativo para mantener la integridad alveolar. En el presente estudio durante la involución, los porcentajes de proliferación fueron significativamente mayores en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* que en no infectados a través del período de observación evaluado, lo cual podría servir como un mecanismo para disminuir el daño luego de la infección y/o contribuir con los mecanismos de reparación del tejido.

Mientras que las toxinas bacterianas o los mediadores proinflamatorios pueden causar la muerte por apoptosis, un incremento en la proliferación celular podría compensar la pérdida de células durante la inflamación. Los mecanismos de inducción de apoptosis por *S. aureus* en células epiteliales mamarias *in vitro* han sido recientemente descritos por Wesson y col. (2000). Sin embargo, los eventos de señalización involucrados en la apoptosis de células epiteliales mamarias y proliferación inducidas por *S. aureus* permanecen aún desconocidos.

Los diferentes aspectos del crecimiento mamario durante el periodo de secado han sido investigados por Capuco y col. (1997). Estos autores determinaron el ADN mamario total y la incorporación de timidina por el tejido mamario en vacas secas. La tasa promedio de incorporación de [³H]timidina por tejido mamario fue 80 % mayor en vacas secas que en vacas lactantes y tendió a incrementarse a medida que avanzaba el periodo de secado. La localización por autorradiografía de la incorporación de timidina demostró que el reemplazo de células fue en su mayoría (>90%) de origen epitelial. Por lo tanto, en vacas el periodo de secado puede ser importante para reemplazar células envejecidas para la próxima lactancia. El incremento significativo de la proliferación celular observado en este estudio con el progreso de la involución del día 7 al 14 en cuartos controles no infectados, sugiere un incremento en las divisiones celulares con el propósito de renovación o reemplazo. Además, el tratamiento con MRB de cuartos no infectados produjo un incremento transitorio en la expresión de PCNA al día 7 del secado comparado con cuartos tratados con placebo; en consecuencia, la proliferación celular fue similar para ambos tratamientos. Estos resultados sugieren que en cuartos no infectados el tratamiento con MRB podría contribuir con un incremento en el reemplazo celular durante la primera semana de la involución.

5.6. Efectos del MRB sobre la expresión de factores de crecimiento en la glándula mamaria.

La inducción experimental de IIM ha sido utilizada para estudiar los cambios funcionales causados por la mastitis en bovinos. Algunos estudios han mostrado que la mastitis induce disrupción de las funciones secretorias normales de glándula mamaria (Sordillo y col., 1989). Sin embargo, los cambios en la expresión de factores de crecimiento (FC) asociados con la mastitis permanecen sin ser entendidos. Además, muy poca información describe la variación en la expresión de FC durante la involución de la glándula mamaria bovina.

5.6.1. IGF-I

Se ha determinado que el tejido mamario de diferentes especies, incluso la bovina, responde a una variedad de FC peptídicos, que incluyen IGF y EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Peri *y col.*, 1992; Grosvenor *y col.*, 1993). Ha sido informado que varios FC como, IGF-I, EGF, aFGF (factor de crecimiento de fibroblastos ácido) y bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico), se incrementan en otros tejidos y en situaciones de estrés, incluso en el shock por calor, reparación de heridas, infecciones y estrés oxidativo (Aloe *y col.*, 1994; Vivekananda *y col.*, 1994). La expresión de estos FC podría relacionarse con los mecanismos de reparación del tejido o podría servir como protección para la célula en situaciones adversas (Schultz *y col.*, 1991; Cioffi *y col.*, 1994). Sin embargo, el rol exacto de estos FC durante la infección mamaria no está totalmente esclarecido, aunque la analogía con otros sistemas sugiere un posible rol en la protección del tejido (Sheffield, 1997).

En nuestro estudio, la localización específica de IGF-I se asoció a primariamente con el epitelio de conductos y alvéolos, es decir, con elementos del parénquima mamario. Las células epiteliales mostraron una marcación intensa en cuartos mamarios infectados y no infectados durante la involución. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que mostraron inmunomarcación intensa para IGF-I en el epitelio cúbico de pequeños y grandes alvéolos en glándula mamaria bovina durante la involución (Plath-Gabler *y col.*, 2001). La expresión mamaria específica de IGF-I en ratones transgénicos demostró que IGF-I promueve la supervivencia de la célula y retrasa la involución mamaria (Hadsell *y col.*, 1996). Estudios *in vitro* con células MCF-7 (línea celular de adenocarcinoma mamario humano) demostraron que IGF-I podría actuar como un inhibidor de la apoptosis de las células mamarias (Geier *y col.*, 1992). Basados en la expresión de IGF-I en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados, nuestros resultados sugieren que, IGF-I es probablemente un importante factor local de remodelación en la glándula mamaria bovina durante las dos primeras semanas de la involución.

Cohick *y col.* (1995) demostraron que la incubación de líneas celulares epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) con citoquinas inflamatorias, incrementó la síntesis de IGFBP. Estas observaciones, así como el hallazgo de que la síntesis de IGFBP se incrementa en glándulas mamarias infectadas, cuando la concentración de citoquinas es alta (Shuster *y col.*, 1995), sugieren una asociación causal entre la producción local de citoquinas y el incremento de los niveles de IGFBP en leche de glándulas mamarias con mastitis. Además, ha sido informado que la concentración de IGF-I en leche se incrementa durante la mastitis inducida

por *E. coli* (Shuster y col., 1995). En la presente investigación, durante la involución, la expresión de IGF-I fue significativamente mayor en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* que en cuartos no infectados. Este resultado es coincidente con el hallazgo anterior de que IGF-I se incrementó en leche de glándulas mamarias inoculados con endotoxinas (Schultz y col., 1991), lo cual podría ser parcialmente explicado por cambios en la permeabilidad con difusión pasiva de IGF-I a la leche desde el suero, ya que la concentración es 25 veces mayor en éste que en la leche. Además, este concepto fue sustentado por la falta de capacidad de las células epiteliales mamarias de sintetizar IGF-I (Yee y col., 1989).

Estudios previos mostraron que el ARNm para varios factores de crecimiento como, aFGF, bFGF, EGF, factor transformante del crecimiento- α (TGF- α), IGF-I e IGF-II se incrementó en glándulas mamarias con mastitis inducidas por *Streptococcus agalactiae* (Sheffield, 1997). Estos resultados indican que la mastitis induce cambios en los niveles de ARNm que codifican para una variedad de factores de crecimiento peptídicos y concuerda con la expresión aumentada de los mismos que ha sido observada en recientes estudios en infecciones mamarias (Chockalingam y col., 2005). Los resultados del presente estudio mostraron que el tratamiento con MRB en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* no influencia los porcentajes de expresión de IGF-I durante las primeras dos semanas de la involución. Solo al día 21 de la involución, los porcentajes de inmunomarcación en cuartos tratados con MRB fueron mayores a los de los controles tratados con placebo. Esta respuesta podría ser consistente con un posible efecto del MRB manteniendo elevado por un período mayor de tiempo la expresión de IGF-I, extendiendo la remodelación del tejido en cuartos infectados. A la inversa, el tratamiento de cuartos mamarios no infectados tratados con MRB no influyó significativamente en la expresión de IGF-I comparado con los cuartos tratados con placebo.

5.6.2. VEGF

A pesar de la función integral de la vasculatura dentro de la glándula mamaria, muy poco ha sido estudiado en lo concerniente a la regulación de su desarrollo durante la mamogénesis normal y durante procesos infecciosos. VEGF es un potente factor angiogénico que regula el desarrollo y la permeabilidad vascular en asociación con interacciones epiteliales-estromales (Hovey y col., 2001).

Análisis por *Northern blot* de ARN aislados de varios estadios del ciclo mamario en roedores, demostraron que VEGF es expresado predominantemente por células epiteliales y que sus niveles disminuyen progresivamente durante la involución de la glándula (Pepper y *col.*, 2000). En glándulas mamarias de ratón, desprovistas de componentes epiteliales, los niveles de VEGF se redujeron en aproximadamente un 75 %, demostrando que el componente epitelial mamario es la mayor fuente de este factor de crecimiento y que aproximadamente el 25 % proviene del estroma (Pepper y *col.*, 2000). En contraste con estos resultados, análisis de la expresión de VEGF en glándulas mamarias de ratón desprovistas del componente epitelial a través de RT-PCR combinada con hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, indicaron que el estroma es el recurso primario de VEGF durante el desarrollo de la glándula mamaria (Hovey y *col.*, 2001). Nuestros hallazgos en glándula mamaria bovina durante la involución demostraron que la expresión de VEGF se asoció predominantemente a estructuras del parénquima mamario como el epitelio de alvéolos y conductos.

En el presente estudio, la expresión de VEGF se incrementó en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* tratados con MRB a medida que la involución progresó, mientras que los cuartos controles tratados con placebo mostraron una elevada expresión de VEGF al día 7 del secado con una progresiva disminución hacia el día 14 y 21. Además, se observó un significativo incremento en la expresión de VEGF al día 7 de la involución en cuartos mamarios no infectados tratados con MRB. Este hallazgo fue coincidente con una expresión aumentada de los porcentajes de células PCNA inmunomarcadas, sugiriendo un intenso recambio celular tanto en células epiteliales como endoteliales, en conductos y alvéolos en este periodo. Contrariamente, en cuartos no infectados tratados con placebo, no se observaron cambios en la expresión de VEGF a lo largo del periodo estudiado, sugiriendo un rol menor de este factor de crecimiento durante la involución normal de la glándula mamaria. Sin embargo, la actividad de VEGF durante la involución de la glándula mamaria bovina aún no ha sido completamente dilucidada.

Un estudio inmunohistoquímico reciente, mostró la expresión predominante de VEGF por macrófagos durante el desarrollo de la glándula mamaria en ratón (Hovey y *col.*, 2001). Por otra parte, McLaren y *col.* (1996) demostraron la expresión de VEGF y su receptor en macrófagos. En la presente investigación, se observó una intensa marcación para VEGF en el citoplasma de macrófagos tanto en cuartos infectados como en no infectados. Estudios tempranos documentaron que el receptor fit-1 para VEGF se expresa en monocitos humanos y que este factor de crecimiento induce la activación y migración de los mismos vía su receptor

(Barleon *y col.*, 1996). Por lo tanto, VEGF induce la quimiotaxis de monocitos/macrófagos en procesos inflamatorios y de remodelación pudiendo actuar de forma autocrina o paracrina.

5.63. TNF- α

TNF- α ha sido detectado y estudiado en glándula mamaria bovina normal e infectada (Hagiwara *y col.*, 2000; Hoeben *y col.*, 2000; Hisaeda *y col.*, 2001; Riollet *y col.*, 2001; Alluwaimi y Cullor 2002; 2003). Numerosos estudios han revelado elevados niveles de TNF- α durante toda la lactancia, involución y en el periparto, excepto en un corto periodo antes del parto cuando este disminuye a niveles indetectables. Elevados niveles de TNF- α podrían estar relacionados con el mantenimiento y regulación de las funciones inmunológicas de las células y factores involucrados en los cambios fisiológicos de la glándula mamaria (Rewinski y Yan 1994; Sordillo *y col.*, 1991; 1997). En el presente estudio, la inmunomarcación de TNF- α se asoció a estructuras del parénquima y estroma de la glándula mamaria y fue detectado durante todos los periodos de la involución estudiados, tanto en cuartos mamarios infectados crónicamente con *S. aureus* como en no infectados.

TNF- α es mayormente conocido como una citoquina inflamatoria, sin embargo, es actualmente sabido, que afecta el crecimiento, diferenciación y/o función de todos los tipos celulares, actuando solo o en conjunto con una variedad de otras citoquinas, hormonas y FC (Sugarman *y col.*, 1985; Takeda *y col.*, 1986; Larrick y Wright, 1990). En el presente estudio, se observó marcación intensa del citoplasma de las células epiteliales alveolares y de conductos excretores de la glándula mamaria. El citoplasma de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos intraepiteliales reaccionó intensamente a la inmunomarcación al igual que los endotelios y fibras musculares lisas de los vasos sanguíneos.

En la glándula mamaria, TNF- α fue primeramente identificado como regulador potencial de la proliferación y diferenciación (Ip *y col.*, 1992). En un modelo *in vitro* de glándula mamaria de rata, estos investigadores demostraron que TNF- α estimula la proliferación de células epiteliales en presencia o ausencia de EGF. Un rol activo de TNF- α durante la involución de la glándula mamaria parece contradictorio, sin embargo, Varela e Ip (1996) formularon la hipótesis que la acción bien conocida de TNF- α como factor inductor de la apoptosis observada en muchos tipos celulares podría estar inhibida en la glándula mamaria por una proteína aún no identificada. Además, una conexión entre TNF- α y la producción de

MMP fue sugerida y ha sido confirmada en detalle. Varela y col. (1997) demostraron que la secreción de MMP-9 es estimulada por TNF- α *in vitro* y postularon que éste podría jugar un rol en la degradación de la matriz extracelular y subsiguiente control de la invasión del estroma que ocurre en la remodelación mamaria. Cabe remarcar que el disparo para la liberación de TNF- α y su fuente exacta en la glándula mamaria son aún desconocidos. Una posibilidad es que las células intersticiales como los leucocitos que se encuentran en la glándula mamaria sirvan como fuente de TNF- α . De hecho, se ha descrito la agregación de linfocitos en la glándula mamaria durante la gestación y lactancia (Solari y Kraehenbuhl, 1987), y se informó que la proporción de macrófagos fue mayor en el periodo del parto en vacas (Park y col., 1992; Sordillo y col., 1995). En el presente estudio durante la involución, los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α en cuartos no infectados que recibieron placebo como tratamiento, se incrementaron en forma significativa al día 7 y 21 del secado. En cuanto al número de macrófagos cuantificados en estos periodos solo se registró en forma coincidente un aumento significativo al día 7. Por otra parte, en cuartos mamarios no infectados, el tratamiento con MRB no modificó los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α con respecto a los controles tratados con placebo en los diferentes periodos evaluados.

Alluwaimi y col. (2003) demostraron que en glándulas mamarias infectadas con *S. aureus*, la actividad transcripcional de TNF- α tiene solo un corto episodio de elevación a las 24 hs post inoculación, seguida de una notable declinación a las 32 hs post inoculación. Las enterotoxinas de *S. aureus* estimulan a las células T para liberar TNF- α y/o citoquinas como IL-2 e IFN- γ (Yokomizo y col., 1995). TNF- α podría estar involucrado en la actividad quimiotáctica de neutrófilos, pero la naturaleza inmunosupresiva de la infección por *S. aureus* podría influenciar la síntesis y producción de TNF- α (Alluwaimi y col., 2003). Por otra parte, Wesson y col. (2000) demostraron que la infección de células MAC-T con *S. aureus* causa un incremento significativo en la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , mientras que la expresión de citoquinas antiinflamatorias como TGF- β e IL-8 permanece inalterada. En concordancia con estos hallazgos, los resultados de los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α en este estudio fueron significativamente mayores en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* que en no infectados, en todos los periodos estudiados independientemente del tratamiento recibido.

Dentro de las citoquinas de fase aguda producidas durante el estadio temprano de la infección, TNF- α es el mayor factor asociado al choque endotóxico durante la mastitis coliforme sobreaguda. Elevadas concentraciones de TNF- α en suero y leche fueron

encontradas en vacas muertas con mastitis aguda por *E. coli* durante el parto (Sordillo y Babiuk, 1991a). Monocitos aislados de vacas lecheras en el parto pueden producir mayor TNF- α después de la estimulación con LPS que monocitos aislados de vacas en la lactancia media o tardía (Sordillo y col., 1995). En el presente estudio, la inoculación intramamaria de una dosis de 0,35 μ moles LPS de *E. coli* como inmunomodulador, en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus*, produjo un aumento significativo en la inmunomarcación para TNF- α al día 21 del secado. En contraste, el tratamiento con placebo no arrojó diferencias en los diferentes estadios estudiados. Por otra parte, este aumento en la marcación de TNF- α en cuartos mamarios infectados, tratados con MRB, coincide con un número significativamente mayor de monocitos-macrófagos al día 7 y 14 del secado. Estos resultados muestran que el MRB utilizado en este estudio posee la capacidad de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias y reclutamiento de monocitos-macrófagos en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* sin causar efectos deletéreos sobre el animal.

5.7. Efecto del MRB sobre los mecanismos de muerte celular.

El periodo de secado es una parte crítica del ciclo de la lactancia en vacas lecheras y es esencial para asegurar una óptima producción de leche en la lactancia siguiente (Capuco y col., 1997; Bachman y Schairer, 2003). Un periodo de secado de la glándula mamaria es requerido para que ocurra el proceso de remodelación, incluida la regresión (apoptosis), proliferación y diferenciación de las células mamarias (Turner y Huynh, 1991; Capuco y col., 1997; Bachman y Schairer, 2003).

La remodelación de la glándula mamaria depende de un equilibrio dinámico entre dos procesos opuestos: mitosis y apoptosis. La apoptosis es responsable de la pérdida de células durante la involución mamaria luego del destete natural o la remoción de las crías en roedores (Quarrie y col., 1995; 1996) y durante el secado en rumiantes (Quarrie y col., 1994; Wilde y col., 1997).

Los genes de la familia Bcl-2 codifican para proteínas que regulan la apoptosis (Schorr y col., 1999) y poseen actividades apoptóticas o antiapoptóticas (promoviendo la supervivencia). Bax es un miembro primario de la familia que promueve la apoptosis de la célula. La estasis al interrumpirse el ordeño determina la expresión de proteínas de supervivencia y muerte dentro de la glándula mamaria. La presencia de proteínas de

supervivencia durante la involución temprana de la glándula mamaria puede ser importante para mantener la integridad de los alvéolos y la reversibilidad de la involución durante las primeras 24-48 hs. Sin embargo la prevalencia de expresión de proteínas proapoptóticas probablemente estimula al tejido a la involución irreversible. En glándula mamaria, las proteínas Bax y Bcl-xs han sido implicadas en la promoción de la involución en este tejido (Capuco *y col.*, 2002).

La involución de la glándula mamaria de la rata fue asociada con altos niveles de la proteína Bax y niveles disminuidos de Bcl-2 (Merlo *y col.*, 1996). Los niveles de ARNm para las proteínas Bax y Bcl-xs se incrementaron luego del primer día del destete en ratas, coincidiendo con la inducción de la apoptosis (Heermeier *y col.*, 1996).

En un estudio realizado por Wareski *y col.*, (2001) en glándula mamaria de cabras durante la lactancia e involución, se reveló que la expresión de Bax se incrementó en forma significativa desde el pico de la lactancia hasta la lactancia tardía permaneciendo elevada en el periodo de secado. Este incremento de Bax también ha sido descrito en glándula mamaria de cerda durante la involución del tejido secretorio (Motyl *y col.*, 2001). En concordancia con estos trabajos, en el presente estudio la inmunomarcación de Bax en células epiteliales de conductos y alvéolos se observó durante todos los estadios de la involución evaluados, y en cuartos no infectados se incrementó en forma significativa con el progreso de la involución a partir del día 14. El tratamiento con MRB aumentó la expresión de Bax en cuartos infectados con *S. aureus*, mientras que en cuartos sanos no se observaron diferencias con los controles.

Luego de la infección bacteriana del tejido mamario dos formas de muerte celular predominan: muerte por necrosis y apoptosis. Long *y col.* (2001) evaluaron la relación entre mastitis y apoptosis de las células mamarias *in vivo* después de la inyección de *E. coli* dentro de la glándula mamaria en vacas Holstein en lactancia. En ese ensayo, la infección despertó un incremento de la expresión de genes proapoptóticos (Bax e IL-1 β -enzima convertidora), mientras que la expresión de genes antiapoptóticos (Bcl-2) se vio disminuida. En el presente estudio, los porcentajes de área inmunomarcada para Bax fueron significativamente mayores en cuartos infectados con *S. aureus* que en cuartos sanos, en todos los periodos evaluados, independientemente del tratamiento recibido. Asimismo, el tratamiento con LPS de *E. coli* como inmunomodulador indujo un aumento significativo en la marcación de Bax en los tres estadios de la involución estudiados.

La infección con bacterias Gram positivas también induce apoptosis. La inducción de mastitis bovina por *Streptococcus agalactiae* incrementa la expresión de marcadores de

apoptosis como RTPM-2 (Sheffield, 1997) y se ha observado que *S. aureus* induce apoptosis de una línea celular epitelial mamaria bovina (MAC-T) (Bayles *y col.*, 1998, Wesson *y col.*, 1998). El mecanismo por el cual *S. aureus* induce apoptosis de las células epiteliales mamarias *in vitro*, involucra la activación de la caspasa-8 y -3, dos componentes clave de la cascada proteolítica que lleva a la apoptosis (Wesson *y col.*, 2000). En este estudio, en cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* no se observaron diferencias en los porcentajes de células epiteliales marcadas para caspasa-3 activa con respecto a los no infectados, sin embargo, en las células estromales los porcentajes de marcación fueron significativamente mayores en infectados que en no infectados en todos los periodos evaluados. Esto sugiere que el mecanismo por el cual *S. aureus* induce apoptosis de las células del estroma mamario *in vivo*, en concordancia con los trabajos *in vitro*, involucra la activación de la caspasa-3. Por otra parte, el tratamiento con LPS de *E. coli* como inmunomodulador en cuartos infectados, produjo un aumento significativo en los porcentajes de células epiteliales y estromales marcadas con caspasa-3 activa en todos los estadios evaluados. Estos resultados muestran que en cuartos crónicamente infectados con *S. aureus*, la inoculación intramamaria de un MRB a base de LPS bacteriano induce un aumento de la apoptosis de las células epiteliales y estromales y que utilizan la vía dependiente de las caspasas para la consumación de la muerte celular. Asimismo, en cuartos sanos, el tratamiento con MRB produjo un incremento significativo en los porcentajes de células estromales inmunomarcadas para caspasa-3 activa en todos los estadios de la involución estudiados. Estos datos concuerdan con un aumento significativo en los porcentajes de células estromales TUNEL (+), lo que sugiere que el tratamiento con MRB en cuartos sanos, induce un incremento de la muerte celular programada en el estroma mamario durante la involución.

En cuartos no infectados tratados con placebo, no se hallaron diferencias en los porcentajes de células epiteliales TUNEL (+) durante los distintos estadios de la involución, en cambio en el estroma a los 14 y 21 días los porcentajes se incrementaron hallándose diferencias significativas con el día 7. Esto podría sugerir que en la glándula mamaria bovina sana, la remodelación del estroma desempeñaría un importante rol en este estadio del desarrollo mamario. La degradación y la apoptosis de las células estromales durante el periodo de secado es una parte crítica de la remodelación mamaria en vacas lecheras. El tratamiento con MRB en cuartos no infectados disminuyó, en forma significativa los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales a partir del día 14 del secado, sin embargo en el estroma los porcentajes de células TUNEL (+) se incrementaron en forma significativa a partir del día 7. Esto sugiere que el tratamiento con MRB ejercería un efecto promotor de la

muerte celular programada en las células del estroma mamario incrementando la remodelación de la glándula durante el secado.

En cuartos infectados tratados con placebo, la apoptosis de las células epiteliales y estromales fue significativamente mayor en el día 21 del secado. Estos resultados concuerdan con los hallados por Long *y col.* (2001) en mastitis inducidas por *E. coli*, donde el índice de apoptosis fue significativamente mayor en tejido con mastitis comparado con controles no infectados. En este estudio también se vieron incrementados la MMP-9, estromelina-1 y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa, lo cual es consistente con degradación de la matriz extracelular y pérdida de células durante la mastitis. En el presente estudio, un índice elevado de marcación para PCNA y Ki-67 en cuartos infectados, sugieren que la mastitis por *S. aureus* también incrementa la proliferación celular, tal vez como mecanismo reparador.

El tratamiento con MRB en cuartos infectados indujo un aumento en los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales al día 7 y 14 del secado, mientras que en las células estromales los porcentajes de muerte celular programada se vieron incrementados durante todos los estadios evaluados. Estos resultados, al igual que los hallados en glándulas sanas tratadas con MRB, demuestran que la inoculación intramamaria de un LPS bacteriano induce apoptosis, principalmente de las células estromales y que utiliza la vía de las caspasas para incrementar la remodelación de la glándula durante los periodos estudiados.

6. CONCLUSIONES

- El tratamiento con MRB redujo la proporción de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* al día 7 de la involución, sin embargo similares números de aislamientos fueron observados al día 14 y 21 de la involución en cuartos tratados con MRB y en controles tratados con placebo.
- El MRB utilizado en este estudio no alteró la arquitectura normal de la glándula mamaria bovina durante la involución, sin embargo, basado en parámetros morfométricos produjo un retraso en la involución durante la primera semana después de la interrupción de la lactancia en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus*.
- El tratamiento con MRB en cuartos infectados con *S. aureus* produjo un incremento significativo en el número de mastocitos y monocitos-macrófagos durante todos los periodos de la involución evaluados, mientras que los eosinófilos aumentaron en forma significativa a partir del día 21 del secado. En cuartos no infectados, el tratamiento con MRB no produjo diferencias en el número de mastocitos con respecto a los controles. Por otra parte, el número de eosinófilos se incrementó solo al día 7 del secado, mientras que los monocitos-macrófagos aumentaron en forma significativa en todos los periodos evaluados.
- Durante la involución en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* se produjo un incremento significativo en la proliferación de células epiteliales y estromales en comparación con cuartos no infectados; y el tratamiento con MRB no afectó la misma. En cuartos mamarios no infectados, el tratamiento con MRB produjo un incremento en la proliferación celular evaluada con PCNA durante la primera semana de la involución.
- Durante la involución en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* se produjo un incremento significativo en los porcentajes de inmunomarcación de IGF-I en comparación con cuartos no infectados. El tratamiento con MRB, en cuartos infectados, produjo un incremento en la marcación de IGF-I a partir del día 21 del secado, mientras que en cuartos no infectados no produjo diferencias.

- Durante la involución en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* se produjo un incremento significativo en la marcación de VEGF en comparación con cuartos no infectados; y el tratamiento con MRB no afectó la misma. En cuartos mamarios no infectados, el tratamiento con MRB produjo un incremento en la inmunomarcación de VEGF durante la primera semana de la involución.
- Durante la involución, en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* se produjo un incremento significativo en la inmunomarcación de TNF- α en comparación con cuartos no infectados; y el tratamiento con MRB incrementó su marcación sólo al día 21 del secado. En cuartos no infectados, el tratamiento con MRB no modificó los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α .
- La cuantificación de la marcación de proteínas pro apoptóticas (Bax), fue significativamente mayor en cuartos infectados con *S. aureus* que en no infectados, independientemente del tratamiento recibido. El tratamiento con MRB en cuartos infectados incrementó la marcación de Bax durante todos los periodos de la involución evaluados. En cuartos no infectados, el tratamiento con MRB no arrojó diferencias con los controles.
- Durante la involución, el tratamiento con MRB en cuartos infectados con *S. aureus* produjo un incremento significativo en el número de células epiteliales y estromales marcadas con caspasa-3 activa. En cuartos no infectados, el tratamiento con MRB produjo un incremento en la marcación de células epiteliales con caspasa -3 activa al día 7 del secado; en cambio en las células estromales el incremento fue significativo durante todos los periodos de la involución evaluados.
- Durante la involución, el tratamiento con MRB en cuartos infectados con *S. aureus* produjo un aumento significativo en los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales y estromales cuantificadas con la técnica de TUNEL. En cuartos no infectados, el tratamiento indujo un aumento significativo en los porcentajes de apoptosis en las células del estroma mamario en todos los periodos evaluados, no así en las células epiteliales donde los porcentajes fueron menores a los de los controles a partir de día 14 del secado.

7. RESUMEN

La glándula mamaria bovina es altamente susceptible a las nuevas infecciones intramamarias (IIM) durante las etapas tempranas del período de vaca seca. Este aumento de la susceptibilidad puede estar asociado con la transición fisiológica de la síntesis activa al estado no lactante. Consecuentemente, los compuestos que incrementen los mecanismos de protección natural de la glándula y aceleren la involución podrían disminuir la incidencia de IIM en el período temprano de vaca seca.

Los agentes que incrementan los mecanismos de protección naturales de la glándula mamaria han sido propuestos para la prevención y tratamiento de las infecciones intramamarias. *Staphylococcus aureus* es un patógeno mayor de la ubre que causa primariamente mastitis subclínicas crónicas que responden pobremente a la terapia con antibióticos. Los objetivos de este trabajo fueron describir los efectos de una infusión intramamaria de un modificador de la respuesta biológica (MRB) a base de lipopolisacárido (LPS) bacteriano sobre: a) la proliferación celular, b) los mecanismos de muerte celular, c) la respuesta inmune inespecífica, d) la cuantificación de células infiltrantes y e) la expresión de factores de crecimiento, en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados durante la involución.

Se conformaron tres grupos de 12 vacas cada uno que fueron sacrificadas a los 7, 14 y 21 días post infusión. Cuartos mamarios no infectados (n=6) e infectados con *S. aureus* (n=6) fueron incluidos en cada grupo (7, 14 y 21 días). Sólo dos cuartos de cada una de estas vacas fueron infundidos con MRB o placebo.

La identificación y cuantificación de células infiltrantes se realizó por técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas (IHQ). La proliferación celular se evaluó por IHQ utilizando anticuerpos específicos para PCNA y KI-67. La muerte celular se evaluó por IHQ mediante la marcación de una proteína proapoptótica (Bax) y caspasa-3 activa, además se realizó la técnica de TUNEL. La marcación y cuantificación de factores de crecimiento (IGF, VEGF y TNF- α) se realizó por IHQ utilizando anticuerpos específicos.

El tratamiento con MRB redujo la proporción de cuartos mamarios infectados con *S. aureus* al día 7 de la involución, sin embargo similares números de aislamientos fueron observados al día 14 y 21 de la involución en cuartos tratados con MRB y en tratados con placebo.

En cuartos mamarios no infectados tratados con MRB y placebo no se observaron diferencias en el número de mastocitos entre tratamientos, en los diferentes estadios de la involución evaluados. Mientras que, en cuartos mamarios infectados con *S. aureus*, tratados con MRB, el número de mastocitos fue significativamente mayor al observado en cuartos

infectados tratados con placebo en los diferentes estadios evaluados. En cuartos mamarios no infectados no se observaron diferencias en el número de eosinófilos entre tratamientos y en los diferentes estadios de la involución evaluados, excepto al día 7 del período seco donde se observó un aumento significativo del número de eosinófilos en el grupo tratado con MRB. En cuartos mamarios infectados con *S. aureus*, tratados con MRB, no se observaron diferencias significativas entre los distintos periodos del secado estudiados, mientras que en tratados con placebo se observó un aumento de eosinófilos al día 7 del secado. El número de monocitos – macrófagos en cuartos mamarios no infectados fue significativamente mayor en tratados con MRB, con recuento de células similares en los tres periodos de la involución estudiados. En cuartos infectados, tratados con MRB, el número de monocitos – macrófagos al día 7 y 14 del secado fue significativamente mayor al observado al día 21.

Los porcentajes de proliferación de las células epiteliales y estromales mamarias fueron mayores en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* independientemente del tratamiento recibido, sin embargo en cuartos mamarios no infectados el tratamiento con MRB produjo un incremento en la proliferación celular al día 7 de la involución.

Los porcentajes de área inmunomarcada para IGF-I en cuartos no infectados no fueron afectados por el tratamiento con MRB y mostraron una disminución significativa al día 21 de la involución. La expresión de IGF-I fue mayor en cuartos infectados que en no infectados en todos los periodos estudiados independientemente del tratamiento recibido.

La marcación de VEGF en cuartos no infectados tratados con MRB fue mayor a los 7 días del secado en comparación con los controles. En cuartos infectados tratados con MRB, los porcentajes de inmunomarcación para VEGF fueron bajos a los 7 días de la involución incrementándose con el progreso de la misma. Por el contrario, en cuartos infectados tratados con placebo, la marcación de VEGF fue mayor al día 7 disminuyendo hacia el día 21 del secado.

En cuartos no infectados, el tratamiento con MRB no modificó los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α . En cuartos mamarios infectados con *S. aureus* la inmunomarcación para TNF- α fue significativamente mayor que en cuartos no infectados; y el tratamiento con MRB incrementó su marcación sólo al día 21 del secado.

En cuartos mamarios no infectados, tratados con MRB, no se observaron diferencias entre los periodos de la involución evaluados y los porcentajes de inmunomarcación para Bax fueron similares a los hallados en los cuartos inoculados con placebo. En cuartos mamarios infectados, el tratamiento con MRB, produjo un incremento significativo en los porcentajes de marcación para Bax durante todos los estadios de la involución evaluados.

En cuartos mamarios no infectados, el tratamiento con MRB produjo un aumento significativo en los porcentajes de células epiteliales inmunomarcadas con caspasa-3 activa al día 7 del secado, en relación a los controles tratados con placebo. Por otra parte, en las células estromales la marcación fue significativamente mayor a la de los controles en todos los estadios estudiados. En cuartos mamarios infectados, tratados con MRB, los porcentajes de células epiteliales y estromales marcadas con caspasa-3 activa fueron significativamente mayores a los hallados en los cuartos tratados con placebo en los tres estadios de la involución estudiados.

En cuartos mamarios no infectados, el tratamiento con MRB, disminuyó en forma significativa los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales a partir del día 14 de la involución con respecto a los controles tratados con placebo. Por otra parte, los porcentajes de apoptosis de las células estromales fueron mayores a los de los controles en todos los periodos de la involución estudiados. En cuartos mamarios infectados, el tratamiento con MRB, produjo un aumento significativo de la apoptosis de las células epiteliales a los 7 y 14 días del secado; mientras que la apoptosis de las células estromales fue mayor a la de los controles en todos los estadios estudiados.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten elaborar las siguientes conclusiones: a) el tratamiento con MRB redujo la proporción de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* al día 7 de la involución, no así al día 14 y 21 donde el número de aislamientos hallados en tratados y controles fueron similares; b) el MRB utilizado no alteró la arquitectura normal de la glándula mamaria bovina durante la involución; c) El tratamiento con MRB en cuartos infectados produjo un incremento significativo en el número de mastocitos y monocitos-macrófagos durante todos los periodos evaluados, mientras que los eosinófilos aumentaron en forma significativa solo al día 21 del secado. En cuartos no infectados, el MRB no produjo diferencias en el número de mastocitos con respecto a los controles. El número de eosinófilos se incrementó solo al día 7 del secado, mientras que los monocitos-macrófagos aumentaron en forma significativa en todos los periodos evaluados; d) en cuartos mamarios infectados se produjo un incremento significativo en la proliferación de células epiteliales y estromales en comparación con cuartos no infectados; y el tratamiento con MRB no afectó la misma. En cuartos no infectados, el tratamiento con MRB produjo un incremento en la proliferación celular evaluada con PCNA durante la primera semana de la involución; e) en cuartos mamarios infectados el tratamiento con MRB, produjo un incremento en la marcación de IGF-I a partir del día 21 del secado, mientras que en cuartos no infectados no produjo diferencias; f) en cuartos infectados se produjo un incremento significativo en la

marcación de VEGF en comparación con cuartos no infectados; y el tratamiento con MRB no afectó la misma. En cuartos mamarios no infectados, el tratamiento con MRB produjo un incremento en la inmunomarcación de VEGF durante la primera semana de la involución; g) en cuartos infectados se produjo un incremento significativo en la inmunomarcación de TNF- α en comparación con cuartos no infectados; y el tratamiento con MRB incrementó su marcación sólo al día 21 del secado. En cuartos no infectados, el tratamiento con MRB no modificó los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α .; h) La cuantificación de la marcación de Bax, fue significativamente mayor en cuartos infectados que en no infectados, independientemente del tratamiento recibido. El MRB en cuartos infectados incrementó la marcación de Bax durante todos los periodos evaluados. En cuartos no infectados, la aplicación del MRB no arrojó diferencias con los controles; i) el MRB en cuartos infectados produjo un incremento significativo en el número de células epiteliales y estromales marcadas con caspasa-3 activa. En cuartos no infectados, el MRB produjo un incremento en la marcación de células epiteliales con caspasa -3 activa al día 7 del secado; en cambio en las células estromales el incremento fue significativo durante todos los periodos evaluados; j) el MRB en cuartos infectados produjo un aumento significativo en los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales y estromales. En cuartos no infectados, el tratamiento indujo un aumento significativo en los porcentajes de apoptosis en las células estromales en todos los periodos evaluados, no así en las células epiteliales donde los porcentajes fueron menores a los de los controles a partir de día 14 del secado.

8. SUMMARY

The bovine mammary gland is highly susceptible to new intramammary infections (IMI) during early stages of the nonlactating period. Since fully involuted mammary glands are less susceptible to IMI, increase in susceptibility has been associated with physiological transition from active synthesis to nonlactating state. Consequently, agents that hasten mammary gland involution while increasing natural protective mechanisms at the early nonlactating period can favor prevention of IMI during the involution process.

Agents that increase natural protective mechanisms have been proposed for prevention and treatment of intramammary infections. *Staphylococcus aureus* is a major pathogen causing primarily sub clinical chronic mastitis, which responds poorly to antibiotic therapy. The objectives of this study were to describe the effects of a single intramammary infusion of a lipopolysaccharide-based biological response modifier (BRM) on a) cellular proliferation, b) cellular death mechanisms, c) unspecific immune response, d) cellular infiltrating cells quantification and e) growth factors expression, in uninfected and *S. aureus*-infected bovine mammary glands during involution.

Three groups of 12 cows were sacrificed at 7, 14 and 21d post BRM infusion. Uninfected (n=6) and *S. aureus*-infected (n=6) mammary quarters were included in each group (7, 14 and 21d). Only two quarters from each cow were infused either with BRM or placebo. The identification and quantification of infiltrating cells was carried out using histochemical and immunohistochemical (IHC) techniques. The cellular proliferation was evaluated by IHC using specific antibodies for PCNA and Ki-67. The cellular death was evaluated by IHC with proapoptotic protein (Bax) and active caspase-3, as well as by the TUNEL technique. The staining and quantification of growth factors (IGF, VEGF y TNF- α) was achieved by IHQ with specific antibodies.

BRM-treatment decreased proportion of *S. aureus*-infected mammary quarters at 7 d of involution but similar number of isolations was observed at 14 and 21 d of involution in either treated or control quarters. In uninfected quarters treated with BRM and placebo no differences were seen in the mast cells number along the observation period. While in infected, BRM-treated quarters, the number of mast cells was significantly higher than infected placebo-treated group at every observation period. In uninfected quarters no differences were seen in the eosinophils number among treatment through the observation period, except at 7 d of drying off where a significant increment in eosinophils number was observed in BRM-treated group. In infected, BRM-treated quarters, non significant differences among observation period were seen, while in placebo-treated quarters an increased number of eosinophils were observed at 7 d of involution. Significant increased

number of monocytes-macrophages was observed in uninfected BRM-treated quarters, with similar numbers of cells along observation period. In infected, BRM-treated quarters, the number of monocytes-macrophages at 7 d and 14 d was greater than at 21 d of involution.

Mammary epithelial and stromal cell proliferation percentage was higher in infected than uninfected quarters at every observation period, irrespective of administered treatment, while uninfected BRM-treated quarters showed increased cell proliferation at 7 d of involution.

IGF-I immunohistochemical stained area in uninfected quarters was not affected by treatment and showed a significant decrease at 21 d of involution. IGF-I immunostaining was greater in infected than uninfected quarters at every observation period, irrespective of treatment received.

Immunostaining for VEGF was greater in BRM-treated uninfected quarters at 7 d of involution compared with controls. In infected quarters VEGF expression was lowest in BRM-treated quarters at 7 d of involution increasing through the observation period. Conversely, untreated infected quarters showed highest VEGF immunostaining at 7 d decreasing at 21 d of involution.

In uninfected quarters, the percentage of stained area for TNF- α was not affected by BRM-treatment. In *S aureus* infected quarters, the immunostaining area for TNF- α was significantly higher than in uninfected quarters; and BRM treatment increased the staining at 21 d of drying off.

In uninfected quarters treated with BRM, no differences were observed between periods and the percentages of stained areas for Bax were similar to placebo-treated quarters. In *S. aureus* infected quarters, the BRM treatment produced a significant increase of stained area for Bax at every observation period.

In uninfected quarters, BRM treatment produced a significant decrease in epithelial apoptosis percentage at 14 d of involution compared to placebo-treated controls. On the other hand, the apoptosis percentage in stromal cells was higher at BRM-treated than untreated controls at every observation period. In infected quarters, BRM treatment produced a significant increment in epithelial apoptosis percentages at 7 and 14 d of drying off; while the stromal cells apoptosis was higher than controls at every sampling period.

The results obtained in the study allow to elaborate the following conclusions: a) BRM treatment reduced proportion of chronic *S. aureus* infected quarters at 7 d of involution but similar number of infected quarters was observed at 14 and 21 d of involution in either treated or control quarters; b) BRM used in this study did not alter normal mammary architecture during involution; c) in infected quarters, BRM treatment produced a significant increased in

number of mast cells and monocytes-macrophages during every sampling period, while eosinophils increased significantly at 21 d of involution. In uninfected quarters, BRM treatment did not produce differences in monocytes number compared to controls. The eosinophils number increased at 7 d of involution, while the monocytes-macrophages number increased at every sampling period; d) in infected quarters, the epithelial and stromal cell proliferation percentage was higher than uninfected quarters at every observation period, and was not affected by the BRM treatment. In uninfected quarters, BRM treatment produced a significant increase of cellular proliferation during the first week of involution; e) In infected quarters, BRM treatment produced an increase in immunostaining for IGF-I detected at 21 d of involution, whereas in uninfected quarters BRM treatment did not alter IGF-I expression; f) in infected quarters, a significant increase in stained area for VEGF was produced, compared with uninfected quarters, and BRM treatment did not influence VEGF expression. In uninfected quarters, BRM treatment produced an increase in immunostaining area for VEGF during the first week of involution; g) in infected quarters an increased stained area for TNF- α was observed, compared with uninfected quarters; BRM treatment increased the stained area at 21 d of involution. In uninfected quarters, BRM treatment, did not affect the immunostaining area for TNF- α .; h) Bax staining quantification was greater in infected than uninfected quarters, irrespective of treatment received. BRM treatment, in infected quarters, produced a significant increase in Bax staining during every sampling period. In uninfected quarters BRM treatment, did not alter Bax staining compared with untreated controls; i) BRM treatment, in infected quarters, produced a significant increase in number of epithelial and stromal cells staining with active caspase-3. In uninfected quarters, BRM treatment produced an increase in number of epithelial cells staining with active caspase-3 at 7 d of involution; while in stromal cell the increase was significant during every observation period; j) BRM treatment in infected quarters produced a significant increase in percentages of apoptosis in epithelial and stromal cells. In uninfected quarters, BRM treatment produced a significant increase in percentage of stromal apoptosis during every observation period, while in epithelial cells percentage of apoptosis was lower than controls starting at 14 d of drying off.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Accorsi, P.A.; Pacioni, B.; Pezzi, C.; Forni, M.; Flint, D.J.; Seren, E. (2002) Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor I in mammary gland involution in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 85:507-513.
- Akers, R.M.; Beal, W.E.; McFadden, T.B.; Capuco, A.V. (1990) Morphometric analysis of involuting bovine mammary tissue after 21 or 42 days of nonsuckling. *J. Anim. Sci.* 68:3604-3613.
- Akira, S.; Hemmi, H. (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 85:85-89.
- Allison, J.P.; Havran, W. (1991) The immunobiology of T cells with invariant gamma delta receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 9:679-705.
- Alluwaimi, A. M.; Rossito, P.V.; Leutenegger, C.M.; Farver, T.B.; Smith, W.L.; Cullor, J.S. (2003) The cytokines marker in the *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J. Vet. Med. B.* 50:105-111.
- Alluwaimi, A.M. (2000) Detection of IL-2 and IFN-gamma m RNA expression in bovine milk cells at the late stage of the lactation period with RT-PCR. *Res. Vet. Sci.* 69:185-187.
- Alluwaimi, A.M. (2004) The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Res. Vet. Sci.* 77:211-222.
- Alluwaimi, A.M.; Cullor, J.S. (2002) Cytokines gene expression patterns of bovine milk during mid and late stages of lactation. *J. Vet. Med. B.* 49:105-100.
- Aloe, L.; Moroni, R.; Mollinari, C.; Tirassa, P. (1994) *Schistosoma mansoni* infection enhances the levels of NGF in the liver and hypothalamus of mice. *Neuroreport.* 5:1030-1032.
- Alving, C.R. (1993) Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvant. *Immunobiol.* 187:430-446.

- Anderson, D.C.; Springer, T.A. (1987) Leukocyte adhesion deficiency: An inherited defect in the MAC-1, LFA-1 and p150, 95 glycoproteins. *Annu. Rev. Med.* 38:175.
- Arends, M.J.; Morris, R.G.; Wyllie, A. H. (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136:593-608.
- Asai, K.; Kai, K.; Rikiishi, H.; Sugawara, S.; Maruyama, Y.; Yamaguchi, T.; Ohta, M.; Kumagai, K. (1998) Variation in CD4C T and CD8C T lymphocyte subpopulations in bovine *aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine* 5:276-283.
- Ashkenazi, A.; Dixit, V.M. (1998) Death receptors: Signaling and modulation. *Science.* 281:1305-1308.
- Baarsch, M.J.; Scamurra, R.W.; Burger, K.; Foss, D.L.; Maheswaran, S.K.; Murtaugh, M.P. (1995) Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 63:3587-3594.
- Bachman, K.C.; Schairer, M.L. (2003) Invited review: bovine studies on optimal lengths of dry periods. *J. Dairy Sci.* 86:3027-3037.
- Barber, M.R.; Yang, T.J. (1998) Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: presence of interleukin-8 in mastitic but not nonmastitic secretions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:82-86.
- Barleon, B.; Sozzani, S.; Zhou, D.; Weich, H.A.; Mantovani, A.; Marme, D. (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor fit-1. *Blood.* 87:3336-3343.
- Basolo, F.; Conaldi, P.; Fiore, L.; Calvo, S.; Toniolo, A. (1993) Normal breast epithelial-cells produce interleukin-6 and interleukin-8 together with tumor-necrosis-factor-defective IL6 expression in mammary-carcinoma. *Int. J. Cancer.* 55:926-930.

- Basta, S.; Knoetig, S.; Summerfield, A.; McCullough, K.C. (2001) Lipopolysaccharide and phormol 12-myristate 13 acetate both impair monocyte differentiation, relating cellular function to virus susceptibility. *Immunology*. 103:488-497.
- Baumrucker, C.R.; Erondy, N.E. (2000) Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J. Mammary Gland. Biol.* 5:53-64.
- Bayles, K.W.; Wesson, C.A.; Liou, L.E.; Fox, L.K.; Bohach, G.A.; Trumble, W.R. (1998) Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66:336-342.
- Beck, H.; Wise, W.; Dodd, F. (1992) Cost benefits analysis of bovine mastitis in the UK. *J. Dairy Res.* 59:449-460.
- Benitez-Bribiesca, L.; Wong, A.; Utrera, D.; Castellanos, E. (2001) The role of mast cell tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *J. Histochem. Cytochem.* 49:1061-1072.
- Bertotto, A.; Gerli, R.; Fabietti, G.; Crupi, S.; Arcangeli, C.; Scalise, F.; Vaccaro, R. (1990) Human breast milk T lymphocytes display the phenotype and functional characteristics of memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 8:1877-1880.
- Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40:845-859.
- Bishop, J.G.; Schanbacher, F.L.; Ferguson, L.C.; Smith, K.L. (1976) *In vitro* growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apo-lactoferrin. *Infect. Immun.* 14:911-918.
- Blosser, T.H. (1979) Economic losses from and National Research Program on mastitis in the United States. *J. Dairy Sci.* 63:487.
- Bramley, A.; Dodd, M. (1984) Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. *J. Dairy Res.* 51:481-492.

- Brown, W.C.; Rice-Ficht, A.C.; Estes, A.C.; Estes, D.M. (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63:45-55.
- Burd, P.R.; Rogers, H.W.; Gordon, J.R.; Martin, C.A.; Jayaraman, S.; Wilson, S.D.; Dvorak, A.M.; Galli, S.J.; Dorf, M.E. (1989) Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J. Exp. Med.* 170:245-257.
- Burton, J.L.; Kehrli, M.E.Jr. (1996). Effects of dexamethasone on bovine circulating T lymphocyte populations. *J. Leukoc. Biol.* 59:90-99.
- Burvenich, C.; Paape, M.J.; Hill, A.W.; Guidry, A.J.; Miller, R.H.; Heyneman, R.; Kremer, W.D.J.; Brand, A. (1994) Role of the neutrophil leukocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Vet. Q.* 16:45-49.
- Cai, T.Q.; Weston, P.G.; Lund, L.A.; Brodie, B.; McKenna, D.J.; Wagner, W.C. (1994) Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res.* 55:934-943.
- Calvinho, L.F.; Almeida R.A.; Oliver, S.P. (2001) Influence of bacterial factors on proliferation of bovine mammary epithelial cells. *Rev. Arg. Microbiol.* 33:28-35.
- Campos, M.; Godson, D.; Hughes, H.; Babiuk, L.; Sordillo, L. (1993) The role of biological response modifiers in disease control. *J. Dairy Sci.* 76:2407-2417.
- Capuco, A.V., Paape, M.J.; Nickerson, S.C. (1986) *In vitro* study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.* 47:663-668.
- Capuco, A.V.; Akers, R.M.; Smith, J.J. (1997) Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acid and histology. *J. Dairy Sci.* 80:477-487.

- Capuco, A.V.; Ellis, S.E.; Hale, S.A.; Long, E.; Erdman, R.A.; Zhao, X.; Paape, M.J. (2003) Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81:18-31.
- Capuco, A.V.; Li, M.; Long, E.; Ren, S.; Hruska, K.S.; Schorr, K.; Furth, P.A. (2002) Concurrent pregnancy retards mammary involution: effects on apoptosis and proliferation of the mammary epithelium after forced weaning of mice. *Biol. Reprod.* 66:1471-1476.
- Capuco, A.V.; Wood, D.L.; Baldwin, L.; Mcleod, K.; Paape, M.J. (2001) Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177-2187.
- Charley B. Effects of immunopotentiating agents on alveolar macrophage properties. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1986;9(2-3):155-9.
- Chepko, G.; Smith, G.H. (1997). Three division-competent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal. *Tissue Cell.* 29:239-253.
- Chepko, G.; Smith, G.H. (1999) Mammary epithelial stem cells: our current understanding. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia.* 4(1):35-52.
- Chockalingam, A., M.J. Paape, and D.D. Bannerman. (2005) Increased milk levels of transforming growth factor- α , β 1, and β 2 during *Escherichia coli*-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* 88:1986-1993.
- Cioffi, W.G., D.C. Gore, L.W. Rue, G. Carrougner, H.P. Guler, W.F. McManus, and B.A. Pruitt, Jr. (1994) Insulin-like growth factor-1 lowers protein oxidation in patients with thermal injury. *Ann. Surg.* 220:310-316.
- Cohick, W.S.; Gockerman, A.; Clemmons, D.R. (1995) Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 synthesis and degradation by platelet-derived growth factor and the IGFs is enhanced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* 164:187-96.

- Coppock, C.E.; Everett, R.W.; Natzke, R.P.; Ainslie, H.R. (1974) Effect of dry period length on Holstein milk production and selected disorders at parturition. *J. Dairy Sci.* 57:712-718.
- Crist, W.L.; Harmon, R.J.; O'Leary, J.; McAllister, A.J. (1997) Mastitis and its control. Educational programs of the Kentucky Cooperative Extension Service, University of Kentucky College of Agriculture. Pp. 13.
- Cullor, J.S.; Fairley, N.; Smith, W.L.; Wood, S.L.; Dellinger, J.D.; Inokuma, M.S.; Souza, I.M. (1990) Hemogram changes in lactating dairy cows given human recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Vet. Pathobiol.* 27:311-316.
- Daley, M.J.; Furda, G.; Dougherty, R.; Coyle, P.A.; Williams, T.J.; Johnston, P. (1992) Potentiation of antibiotic therapy for bovine mastitis by recombinant bovine interleukin-2. *J Dairy Sci.* 75:3330-3338.
- Daley, M.J.; William, T.; Dougherty, R.; Coyle, P.; Furda, G.; Hayes, P. (1991) *Staphylococcus aureus* mastitis: Pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 and interleukin-2. *J. Dairy Sci.* 74:4413.
- Daley, M.J.; Williams, T.; Dougherty, R.; Furda, G.; Hayes, P.; Coyle, P. (1993) Prevention and therapy of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine.* 5:276-283.
- Daley, M.J.; Williams, T.J.; Dougherty, R. (1990) Role of bovine cytokines in pathophysiology and therapy of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 73:235-243.
- Dallard, B.E.; Ortega, H.H; Lorente, J.A.; Romano, G. (2005) Immunolocalization and expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the ovine mammary gland during mammogenesis, lactation and involution. *Small Ruminant Res.* 58:1-11.

- Detilleux, J.C.; Kehrli, M.E.; Stabel, J.R.; Freeman, A.E.; Kelley, D.H. (1995) Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44:251-267.
- Dosogne, H.; Vangroenweghe, F.; Mehrzad, J.; Massart-Leen, A.M.; Burvenich, C. (2003) Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *J. Dairy Sci.* 86:828-834.
- Dziewanowska, K.; Patti, J.M.; Deobald, C.F.; Bayles, K.W.; Trumble, W.R.; Bohach, G.A. (1999) Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67:4673-4678.
- Ellis, C.; Dyson, M.; Stephenson, M.J.; Maltby, E.L. (2005) HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence *in situ* hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J. Clin. Pathol.* 58:710-714.
- Enomoto, K.; Furuya, K.; Yamagishi, S.; Maeno, T. (1992) Mechanically-induced electrical and intracellular responses in normal and cancerous mammary cells. *Cell Calcium.* 13:501-511.
- Enomoto, K.; Furuya, K.; Yamagishi, S.; Oka, T.; Maeno, T. (1994) The increase in intracellular Ca²⁺ concentration by mechanical stimulation is propagated via release of pyrophorylated nucleotides in mammary epithelial cells. *Archiv.* 427:533-542.
- Erridge, C.; Bennet-Guerrero, E.; Poxton, I.R. (2002b) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microb. Infect.* 4:837-851.
- Erridge, C.; Stewart, J.; Bennet-Guerrero, E.; McIntosh, Y.J.; Poxton, I.R. (2002a) The biological activity of a liposomal complete core lipopolysaccharide vaccine. *J. Endotoxin Res.* 8:39-46.

- Feng, Z.; Marti, A.; Jehn, B.; Altermatt, H.J.; Chicaiza, G.; Jaggi, R. (1995) Glucorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J. Cell Biol.* 131:1095-1103.
- Fernández Botran, R.; Chilton, P.M.; Ma, Y. (1996) Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy. *Adv. Immunol.* 63:269-336.
- Fetherston, C. (1998) Risk factors for lactation mastitis. *J. Hum. Lact.* 14:101-109.
- Fitzpatrick, J.L.; Cripps, P.J.; Hill, A.W., Bland, P.W.; Stokes, C.R. (1992). MHCclass II expression in the bovine mammary gland. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32:13-23.
- Folkman, J. (1982) Angiogenesis: initiation and control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 401:212–227.
- Fukushima, N.; Satoh, T.; Sano, M.; Tokunaga, O. (2001) Angiogenesis and mast cells in non-Hodgkin's lymphoma: a strong correlation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma.* 42:709–720.
- Geier, A.; Haimshon, M.; Beery, R.; Hemi, R.; Lunenfeld, B. (1992) Insulin-like growth factor-1 inhibits cell death induced by cycloheximide in MCF-7 cells: A model system for analyzing control of cell death. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:725-729.
- Goodman, R.E.; Schanbacher, F. L. (1991). Bovine lactoferrin mRNA: Sequence, analysis, and expression in the mammary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:75-84.
- Gouon-Evans, V.; Rothenberg, M.E.; Pollard, J.W. (2000) Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development.* 127:2269-2282.
- Granville, D.J.; Carthy, C.M.; Hunt, D.W.; McManus, B.M. (1998) Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest.* 78: 893-913.
- Grosvenor, C.E.; Picciano, M.F.; Baumrucker, C.R. (1993) Hormones and growth factors in milk. *Endocr. Rev.* 14:710-716.

- Gudding, R.; McDonald, J.S.; Cheville, N.S. (1984) Pathogenesis of *S. aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *Am. Vet. Res.* 45:2525-2531.
- Guidry, A.J.; Miller, R.H. (1986) Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. *J. Dairy Sci.* 69:1799-1805.
- Hadden, J.W. (1993) Immunostimulants. *Immunol. Today.* 14:275-80.
- Hadsell, D.L.; Bonnette, S.G.; Lee, A.V. (2002) Genetic manipulation of the IGF-I axis to regulate mammary gland development and function. *J. Dairy Sci.* 85:365-377.
- Hadsell, D.L.; Greenberg, N.M.; Fligger, J.M.; Baumrucker, C.R.; Rosen, J.M. (1996) Targeted expression of des (1-3) human insulin-like growth factor I in transgenic mice influences mammary gland development and IGF-binding protein expression. *Endocrinology.* 137:1-2.
- Hagiwara, K.; Kataoka, S.; Yamanaka, H.; Kirisawa, R.; Iwai, H. (2000) Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76:183-190.
- Harmon, R.J.; Heald, C.W. (1982) Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 43:992-998.
- Heermeier, K.; Benedict, M.; Li, M.; Furth, P.; Nunez, G.; Hennighausen, L. (1996) Bax and Bcl-xs are induced at the onset of apoptosis in involuting mammary epithelial cells. *Mech Dev.* 56:197-207.
- Helminen, H.J. Ericsson, J.L. (1971) Effects of enforced milk stasis on mammary gland epithelium, with special reference to changes in lysosomes and lysosomal enzymes. *Exp. Cell Res.* 68:411-427.

- Hensen, S.M.; Pavicic, M.J.; Lohuis, J.A.; Poutrel, B. (2000) Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *S. aureus* strain. *J. Dairy Sci.* 83:418-429.
- Heyneman, R.; Burvenich, C. (1992) Kinetics and characteristics of bovine neutrophil alkaline phosphatase during acute *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* 75(7):1826-1834.
- Hillerton, J.E.; Walton, A.W. (1991) Identification of subclinical mastitis with a hand-held electrical conductivity meter. *Vet Rec.* 128:513-525.
- Hisaeda, K.; Hagiwara, K.; Eguchi, J.; Yamanaka, H.; Kirisawa, R.; Iwai, H. (2001) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 63:1009-1011.
- Hoeben, D.; Burvenich, C.; Trevisi, E.; Bertoni, G.; Hamann, J.; Blum, R.M.; Blum, J.W. (2000) Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 67:503-514.
- Hogan, J.S.; Harmon, R.J.; González, R.N.; Nickerson, S.C.; Oliver, S.P.; Pankey, J.W.; Smith, K.L. (1999) Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison, WI. Pg.222.
- Hogan, J.S.; Pankey, J.W.; Duthie, A.H. (1987) Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 70:927-934.
- Holst, B.D.; Hurley, W.L.; Nelson, D.R. (1987) Involution of the bovine mammary gland: Histological and ultrastructural changes. *J. Dairy Sci.* 70:935-944.
- Hopster, H.; van derWerf, J.T.; Blokhuis, H.J. (1998) Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66:83-97.

- Hovey, R.C., A.S. Goldhar, J. Baffi, and B.K Vonderhaar. (2001) Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor expression in epithelial and stromal cells during mouse mammary gland development. *Mol. Endocrinol.* 15:819-831.
- Huguet, E.L.; Smith, K.; Bicknell, R.; Harris, A.L. (1995) Regulation of Wnt5a expression in human mammary epithelial cells by cell shape, confluence and hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* 270:12851-12856.
- Hurley, W.L. (1989) Mammary gland function during involution. *J. Dairy Sci.* 72:1637-1646.
- Inchaisri, C.; Persson-Waller, K.; Jahannisson, A. (2000) Studies on the modulation of leukocytes subpopulations and immunoglobulins following intramammary infusion of B1,3-glucan into the bovine udder during the dry period. *J. Vet. Med. B.* 47:373-386.
- Ip, M.M.; Shoemaker, S.F.; Darcy, K.M. (1992) Regulation of rat mammary epithelial cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology.* 130:2833-2844.
- Ismail, H.I.; Hashimoto, Y.; Kon, Y.; Okada, K.; Davis, W.C.; Iwanaga, T. (1996) Lymphocyte subpopulations in the mammary gland of the goat. *Vet Immunol Immunopathol.* 52:201-212.
- Ito, T; Kodama, M. (1996) Demonstration by reverse transcription-polymerase chain reaction of multiple cytokine mRNA expression in bovine alveolar macrophages and peripheral blood mononuclear cells. *Res. Vet. Sci.* 60:94-96.
- Jaggi, R.; Marti, K.G.; Feng, Z.; Friis, R. (1996) Regulation of a physiological apoptosis: mouse mammary involution. *J. Dairy Sci.* 79:1074-1084.
- Jensen, D.L.; Eberhart, R.J. (1981) Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am J Vet Res.* 42:743-747.

- Jones, G.M. (1998) Mastitis cost? Dairy Pipeline: December of 1998, Virginia Cooperative Extension. Virginia Polytechnic Institute and State University. Actualization 7 of November 2002. <http://www.dasc.vt.edu/jones/mastcost.htm>.
- Jones, J.I.; Clemmons, D.R. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16:3-34.
- Kehrli Jr., ME, Nonnecke, B.J.; Roth, J.A. (1989) Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50:207-214.
- Kehrli, M.E. Jr; Harp, J.A. (2001) Immunity in the mammary gland. *Vet. Clin. North A. Food Anim. Pract.* 17:495-516.
- Kehrli, M.E., Burton, J.L.; Nonnecke, B.J.; Lee, E.K. (1999) Effects of stress on leukocyte trafficking and immune responses: Implications for vaccination. *Adv. Vet. Med.* 41:61-81.
- Kehrli, M.E., Cullor, J.S., Nickerson, S.C. (1991) Immunobiology of hematopoietic colony-stimulating factors: potential application to disease prevention in the bovine. *Dairy Sci.* 74: 4399-4412.
- Kherli, M.E.; Toth, J.A. (1990) Chemically induced immunomodulation in domestic food animals. *Adv. Vet. Sci. Com. Med.* 35:103-119.
- Klir, J.J.; Shahbazian, M.; Matteri, R.L.; Fritsche, K.L.; Becker, B.A. (1997) Effects of thermal environment on response to acute peripheral lipopolysaccharide challenge exposure in neonatal pig. *Am. J. Vet. Res.* 58:364-369.
- Kordon, E.C.; Smith, G.H. (1998) An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development.* 125:1921-1930.
- Landmann, R.; Ludwig, C.; Obrist, R.; Obrecht, J.P. (1991) Effect of cytokines and lipopolysaccharide on CD14 antigen expression in human monocytes and macrophages. *J. Cell. Biochem.* 47:317-325.

- Larrick, J.W.; Wright, S.C. (1990) Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J* 4:3215-3223.
- Lascelles, A.K.; Lee, C.S. (1978) Involution of the Mammary Gland. In B. L. Larson (ed.), *Lactation: A Comprehensive Treatise*, Vol. IV, Academic Press, Inc., New York, pp. 115-177.
- Lee, C.S.; McCauley, I.; Hartmann, P.E. (1983) Light and electron microscopy of cells in pig colostrum, milk and involution secretion. *Acta Anat.* 116:126–135.
- Lee, C.S.; Wooding, F.B.P.; Kemp, P. (1980) Identification properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrums and milk from normal cows. *J. Dairy Res.* 47:39-47.
- Lee, E.K.; Kehrli, M.E.Jr. (1998) Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 59:37–43.
- Lee, E.Y.; Parry, G.; Bissell, M.J. (1984) Modulation of secreted proteins of mouse mammary epithelial cells by the collagenous substrata. *J. Cell Biol.* 98:146-155.
- Lee, J.W.; Paape, M.J.; Elsasser, T.H.; Zhao, X. (2003) Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Dairy Sci.* 86:2382-2389.
- Lehtolainen T, Pohjanvirta T, Pyorala S, Pelkonen S. (2003) Association between virulence factors and clinical course of *Escherichia coli* mastitis. *Acta Vet Scand.* 44:203-205.
- Lengemann, F.W.; Pitzrick, M. (1986) Effects of endotoxin on mammary secretion of lactating goats. *J Dairy Sci.* 69:1250-1258.
- Lescouret, F.; Coulon, J.B. (1994) Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:2289-2301.

- Levi-Schaffer, F.; Pe'er, J. (2001) Mast cells and angiogenesis. *Clin. Exp. Allergy*. 31:521–524.
- Li, M.; Hu, J.; Heermeier, K.; Hennighausen, L.; Furth, P. (1996) Apoptosis and remodeling of mammary gland tissue during involution proceeds through p53-independent pathways. *Cell Growth Differ.* 7:13-20.
- Li, P.; Rudland, P.S.; Fernig, D.G.; Finch, L.M.; Wilde, C.J. (1999) Modulation of mammary development and programmed cell death by the frequency of milk removal in lactating goats. *J Physiol.* 15:885-900.
- Liu, X.J.; Malkowski, M.; Guo, Y.; Erickson, G.F.; Shimasaki, S.; Ling, N. (1993) Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology*. 132:1176-1183.
- Long, E.; Capuco, A.V.; Wood, D.L.; Sonstegard, T.; Tomita, G.; Paape, M.J.; Zhao, X. (2001) *Escherichia coli* induces apoptosis and proliferation of mammary cells. *Cell Death Differ.* 8:808-816.
- Lund, L.R.; Romer, J.; Thomasset, N.; Solberg, H.; Pyke, C.; Bissell, M.J.; Dano, K.; Werb Z. (1996) Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: Proteinase-independent and -dependent pathways. *Development*. 22:181-193.
- Magnusson, U. (1999) Longitudinal study of lymphocyte subsets and major histocompatibility complex-class II expressing cells in mammary glands of sows. *Am. J. Vet. Res.* 60:546-548.
- Maliszewski, C.D.; Wright, S.D. (1991) CD14 and immune response to lipopolysaccharide. *Science*. 252:1321-1322.
- Mallard, B.A.; Dekkers, J.C.; Ireland, M.J.; Leslie, K.E.; Sharif, S.; Van Kampen, C.L.; Wagter, L.; Wilkie, B.N. (1998) Alteration in immune responsiveness during the

peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.* 81:585-595.

Manlongat, N.; Yang, T.; Hinckley, L.; Bendel, R.; Krider, H. (1998) Physiologic-chemoattractant-induced migration of polymorphonuclear leukocytes in milk. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:375-381.

Marshall, N.E.; Ziegler, H.K (1989) Role of lipopolysaccharide in induction of Ia expression during infection with Gram-negative bacteria. *Infect Immun.* 57:1556-1560.

Masso-Welch, P.; Darcy, K.; Stangle-Castor, N.; Ip, M. (2000) A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 5:165-185.

Matthews, K.R.; Rejman, J.J.; Turner, J.D.; Oliver, S.P. (1994) Proliferation of a bovine mammary epithelial cell line in the presence of bacterial virulence factors. *J. Dairy Sci.* 77:2959-2964.

Matitashvili, E.; Bramley, A.J.; Zavizion, B. (1997) An *in vitro* approach to ruminant mammary gland biology. *Biotechnol. Adv.* 15:17-41.

Matsushima, K.; Oppenheim, J.J. (1989) Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine.* 1:2-13.

Mayberry, H.E. (1964) Macrophages in post-secretory mammary involution in mice. *Anat. Rec.* 149:99-112.

McLaren, J.; Prentice, A.; Charnock-Jones, D.S.; Millican, S.A.; Muller, K.H.; Sharkey, A.M.; Smith, S.K. (1996) Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J. Clin. Invest.* 98:482-489.

Merlo, G.R.; Graus-Porta, D.; Cella, N.; Marte, B.M.; Taverna, D.; Hynes, N.E. (1996) Growth, differentiation and survival of HC11 mammary epithelial cells: diverse effects

of receptor tyrosine kinase-activating peptide growth factors. *Eur J Cell Biol.* 70:97-105.

Miescher, S.; Schreyer, M.; Barras, C.; Capasso, C.; Von Fliedner, V. (1990) Sparse distributions of gamma delta T lymphocytes around human epithelial tumors predominantly infiltrated by primed memory T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 32:81-87.

Miller, R.H.; Gundry, A.J.; Paape, M.J.; Dulin, A.M.; Fulton, L.A. (1988) Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 49:42-45.

Mol, R.M. (2000) Automated detection of oestrus and mastitis in dairy cows. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands. Pp.177.

Monks, J.; Geske, F.; Lehman, L.; Fadok, V.A. (2002) Do inflammatory cells participate in mammary gland involution? *J. Mammary Gland Biol.* 7:163-176.

Moreira da Silva, F.; Burvenich, C.; Massart-Leen, A.M.; Russell-Pinto, F.F. (1997) Effect of some reproduction hormones on the oxidative burst of bovine neutrophils. *Flem. Vet. J.* 66:297-314.

Motyl, T.; Gajkowska, B.; Wojewodzka, U.; Wareski, P.; Rekiel, A.; Ploszaj, T. (2001) Expression of apoptosis-related proteins in involuting mammary gland of sow. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 128:635-646.

Mueller, M.; Brandenburg, K.; Dedrick, R.; Schromm, A.B.; Seydel, U. (2005) Phospholipids inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cell activation: a role for LPS-binding protein. *J. Immunol.* 174:1091-1096.

Mulcahy, G.; Quinn, P.J. (1986) A review of immunomodulators and their applications in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therapy.* 9:119-139.

- Nakajima, Y.; Mikami, O.; Yoshioka, M.; Motoi, Y.; Ito, T.; Ishikawa, Y.; Fuse, M.; Nakano, K.; Yasukawa, K. (1997) Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. *Res. Vet. Sci.* 62:297-298.
- Neuenschwander, S.; Schwartz, A.; Wood, T.L.; Roberts, C.T.Jr.; Hennighausen, L.; LeRoith, D. (1996) Involution of the of lactating mammary gland is inhibited by the IGF system in a transgenic mouse model. *J. Clin. Invest.* 97:2225-2232
- Nickerson, S.C. (1987) Resistance mechanisms of the bovine udder: New implications for mastitis control at the teat end. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191:1484-1488.
- Nickerson, S.C. (1989) Immunological aspects of mammary involution. *J. Dairy Sci.* 72:1665-1678.
- Nickerson, S.C.; Boddie, R.L.; Owens, W.E.; Watts, J.L. (1990) Effects of novel intramammary device models on incidence of mastitis after experimental challenge. *J. Dairy Sci.* 73:2774-2784.
- Nickerson, S.C.; Owens, W.E.; Boddie, R.L.; Boddie, N.T. (1992) The effect of chronic immunostimulation of the nonlactating bovine mammary gland with interleukin-2, pokeweed mitogen, and lipopolysaccharide. *J. Dairy Sci.* 75:3339-3351.
- Nickerson, S.C.; Owens, W.E.; Rejman, J.J.; Oliver, S.P. (1993) Effects of interleukins-1 and interleukines-2 on mammary gland leukocyte populations and histology during the early nonlactating period. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 40:621-633.
- Nickerson, S.C.; Owens, W.E.; Watts, J.L. (1989) Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72: 3286-3294.
- Niemialtowski, M.; Nonnecke, B.J.; Targowski, S.P. (1988) Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis. *J Dairy Sci.* 71:780-787.

- Nordin, W.; Lee, C.S. (1982) Cytology of milk in guinea pigs. *Acta Anat.* 113:135-144.
- Norimatsu, M.; Ono, T.; Aoki, A.; Ohishi, K.; Takahashi, T.; Watanabe, G.; Taya, K.; Sasamoto, S.; Tamura, Y. (1995) Lipopolysaccharide-induced apoptosis in swine lymphocytes *in vivo*. *Infect Immun.* 63:1122-1126.
- Norman, G.; Streiner, D. (1996) *Bioestadística*. Editorial Harcourt Brace, Barcelona, España.
- Norrby, K. (2002) Mast cells and angiogenesis. *A.M.P.I.S.* 110:355–371.
- Okada, H.; Ito, T.; Ohtsuka, H.; Kirisawa, R.; Iwai, H.; Yamashita, K.; Yoshino, T.; Rosol, T.J. (1997) Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells *in vitro*. *J. Vet. Med. Sci.* 59:503-507.
- Oliver, S.P.; Michell, B.A. (1983) Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *J. Dairy Sci.* 66:1162.
- Oliver, S.P.; Smith, K.L. (1982a) Bovine mammary involution following intramammary infusion of colchicine and endotoxin at drying off. *J. Dairy Sci.* 65:801-813.
- Oliver, S.P.; Smith, K.L. (1982b) Nonantibiotic approach in control of bovine mastitis during dry period. *J. Dairy Sci.* 65:2119-2124.
- Oliver, S.P.; Sordillo, L.M. (1988) Udder health in the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 71:2584-2606.
- Oliver, S.P.; Sordillo, L.M. (1989) Approaches to the manipulation of mammary involution. *J. Dairy Sci.* 72:1647-1664.
- Ortega, H.H.; Salvetti, N.R.; Amable, P.; Dallard, B.E.; Baravalle, C.; Barbeito, C.G.; Gimeno, E.J. (2006) Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats. *Anat. Histol. Embryol.* 35:1–9.

- Osborn, M.J. (1963) Studies on the Gram-negative cell wall, I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. Proc. Nat. Acad. Sci. 50:499-506.
- Paape, M.J.; Lilius, E.M.; Wiitanen, P.A.; Kontio, M.P.; Miller, R.H. (1996) Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. Am J Vet Res. 57:477-482.
- Paape, M.J.; Miller, R.H.; Young, M.D.; Peters, R.R. (1992) Influence of involution on intramammary phagocytic defense mechanisms. J. Dairy Sci. 75:1849-1856.
- Paape, M.J.; Shafer-Weaver, K.; Capuco, A.V.; Van Oostveldt, K.; Burvenich, C. (2000) Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. Adv. Exp. Med. Biol. 480:259-277.
- Paape, M.J.; Tucker, H.A. (1969) Influence of length of dry period on subsequent lactation in the rat. J. Dairy Sci. 52:518-522.
- Paape, M.J.; Wergin, W.P. (1977) The leukocyte as a defense mechanism. J. Am. Vet. Med. Assoc. 15:1214-1223.
- Pang, G.; Couch, L.; Batey, R.; Clancy, R.; Cripps, A. (1994) GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. Clin. Exp. Immunol. 96:437-443.
- Park, Y.H.; Fox, L.K.; Hamilton, M.J.; Davis, W.C. (1992) Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. J. Dairy Sci. 75:998-1002.
- Park, Y.H.; Fox, L.K.; Hamilton, M.J.; Davis, W.C. (1993) Suppression of proliferative responses of BoCD4C T lymphocytes by activated BoCD8C T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 36:137-151.

- Pell, J.M. (1995) Principles of immunomodulation. *Livest Prod. Sci.* 42:122-133.
- Pepper, M.S., D. Baetens, S.J. Mandriota, C. Di Sanza, S. Oikemus, T. Lane, J. Soriano, R. Montesano, Iruela-Arispe, L. (2000) Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Develop. Dynamics.* 218:507-524.
- Peri, I., A. Shamay, M.F. Mcgrath, R.J. Collier, and A. Gertler (1992) Comparative mitogenic and galactopoietic effects of IGF-I, IGF-II and Des-3-IGF-I in bovine mammary gland *in vitro*. *Cell Biol. Int. Rep.* 16:359-368.
- Perkins, K.H.; Vandehaar, M.J.; Burton, J.L.; Liesman, J.S.; Erskine, R.J.; Elsasser, T.H. (2002) Clinical responses to intramammary endotoxin infusion in dairy cows subjected to feed restriction. *J. Dairy Sci.* 85:1724-1731.
- Persson Waller, K.; Golditz, I.G.; Lun, S.; Ostensson, K. (2003) Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 74:31-36.
- Persson, K.; Larsson, I.; Hallen Sandgren, C. (1993) Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37:99-112.
- Pitelka, D.R.; Taggart, B.N. (1983) Mechanical tension induces lateral movement of intramembrane components of the tight junction: Studies on mouse mammary cells in culture. *J. Cell Biol.* 96:606-612.
- Plath-Gabler, A., C. Gabler, F. Sinowatz, B. Berisha, and D. Schams. (2001) The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. *J. Endocrinol.* 168:38-48.
- Politis, I.; Zhao, X.; McBride, B.W.; Burton, J.H. (1992) Function of bovine mammary macrophages as antigen presenting cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30:399-410.

- Preisler, M.T.; Weber, P.S.; Tempelman, R.J.; Erskine, R.J.; Hunt, H.; Burton, J.L. (2000) Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. *Am. J. Vet. Res.* 61:14-19.
- Quarrie, L.; Addey, C.; Wilde, C. (1996) Programmed cell death during mammary involution induced by weaning, litter removal and milk stasis. *J. Cell. Physiol.* 168:559-569.
- Quarrie, L.; Addey, C.V.P.; Wilde, C.J. (1995). Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labeling. *Cell Tissue Res.* 281:413-419.
- Quarrie, L.H.; Addey, C.V.; Wilde, C.J. (1994) Local regulation of mammary apoptosis in the lactating goat. *Biochem. Soc. Trans.* 22:178-185.
- Quinn, P.J. (1990) Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Adv. Vet. Sci. Com. Med.* 35:43-99.
- Quiroga, G.H.; Nickerson, S.C. (1993) Histologic response of the Heifer mammary gland to intramammary infusion of interleukin-2 or interferon- γ . *J. Dairy Sci.* 76:2913-2924.
- Rainard, P.; Poutrel, B. (1995) Deposition of complement components on *Streptococcus agalactiae* in bovine milk in the absence of inflammation. *Infect. Immun.* 63:3422-3427.
- Rajaram, S.; Baylink, D.J.; Mohan, S. (1997) Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr. Rev.* 18:801-831.
- Raubertas, R.F.; Shook, G.E. (1982) Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. *J. Dairy Sci.* 65:419-425.
- Reed, J.C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157:1415-1430.
- Rewinski, M.J.; Yang, T.J. (1994) Lactation stage-dependent changes in levels of tumor necrosis factor (TNF)/cachectin in milk. *Am. J. Reprod. Immunol.* 31:70-176.

- Richards, R.C.; Benson, G.K. (1971) Ultrastructural changes accompanying involution of the mammary gland in the albino rat. *J. Endocrinol.* 51:127-135.
- Riollet, C.; Rainard, P.; Poutrel, B. (2000) Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:161-167.
- Riollet, C.; Rainard, P.; Poutrel, B. (2001) Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 84:1077-1084.
- Rosenblatt, J.; Raff, M.C.; Cramer, L.P. (2001) An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 11:1847-1857.
- Sandholm, M.; Pyörälä, S. (1995) Dry cow therapy. In ; *The Bovine Udder and Mastitis*. Sandholm, M.; Honkanen-Buzalski, T. ; Kaartinen, L. ; Pyörälä, S. (eds). University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. Pp. 209-214.
- Schalm, O.W.; Lasmanis, J.; Jain, N.C. (1976) Conversion of chronic staphylococcal mastitis to acute gangrenous mastitis after neutropenia in blood and bone marrow produced by an equine anti-bovine leukocyte. *Am. J. Vet. Res.* 37:885-890.
- Schanbacher, F.L.; Goodman, R.E.; Talhouk, R.S. (1993) Bovine mammary lactoferrin: Implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J. Dairy Sci.* 76:3812-3831.
- Schorr, K.; Li, M.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; Furth, P.A. (1999) Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J. Mammary Gland. Biol.* 4:153-164.
- Schultz, G., D. S. Rotatori, and W. Clark. (1991) EGF and TGF- α in wound healing and repair. *J. Cell Biochem.* 45:346-352.

- Selsted, M.E.; Tang, Y.Q.; Morris, W.L.; McQuire, P.A.; Nonotny, M.J.; Smith, W.; Henschen, A.H.; Cullor, J.S. (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of the beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268:6641-6644.
- Selvan, R.S.; Butterfield, J.H.; Krangel, M.S. (1994) Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. *J. Biol Chem.* 13:13893-8.
- Shafer-Weaver, K.; Sordillo, L.M. (1996) Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 79:1347-1352.
- Shafer-Weaver, K.A, Corl, C.M.; Sordillo, L.M. (1999) Shifts in bovine CD4C subpopulations increase TH-2 compared to TH-1 effector cells during the postpartum period. *J. Dairy Sci.* 82:1696-1706.
- Shafer-Weaver, K.A.; Pighetti, G.M.; Sordillo, L.M. (1996) Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 212:271-280.
- Shafer-Weaver, K.A.; Sordillo, L.M. (1997) Bovine CD8C suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56: 53-64.
- Sheffield, L.G. (1997) Mastitis increases growth factor messenger ribonucleic acid in bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* 80:2020-2024.
- Sheffield, L.G.; Kotolski, L.C. (1992) Prolactin inhibits programmed cell death during mammary gland involution. *FASEB J.* 6:A1184.
- Shuster, D.E.; Kehrli, M.E.Jr.; Baumrucker, G. (1995) Relationship of inflammatory cytokines , growth hormone, and insulin-like growth factor I to reduce performance during infectious diseases. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210:140-149.

- Shuster, D.E.; Kehrli, M.E.Jr.; Rainard, P.; Paape, M. (1997) Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65:3286-3292.
- Shuster, D.E.; Kherli, M.E. (1995) Administration of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist during endotoxin-induced mastitis in cows. *Am. J. Vet. Res.* 56:313-320.
- Shuster, D.E.; Lee, E.K.; Kehrli, M.E. (1996) Bacterial growth, inflammatory cytokine production and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am. J. Vet. Res.* 57:1569-1575.
- Singh, J.; Sidhu, S.S.; Dhaliwal, G.S.; Pangaonkar, G.R.; Nanda, A.S.; Grewal, A.S. (2000) Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Anim. Reprod. Sci.* 59:159-166.
- Slebodzinski, A.B.; Mallinowski, E.; Lipezak, W. (2002) Concentrations of triiodothyronine (T3), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in milk from healthy and naturally infected quarters of cows. *Res. Vet. Sci.* 72:17-21.
- Smith, G.H. (1996) Experimental mammary epithelial morphogenesis in an *in vivo* model: Evidence for distinct cellular progenitors of the ductal and lobular phenotype. *Breast Cancer Res. Treat.* 39:21-31.
- Smith, G.H.; Chepko, G. (2001) Mammary epithelial stem cells. *Microsc. Res. Tech.* 15:190-203.
- Solari, R.; Kraehenbuhl, J. (1987) Receptor-mediated transepithelial transport of polymeric immunoglobulins. In: Neville M, Daniel C, editors. *The mammary gland. Development, regulation, and function*. New York: Plenum Press; Pp. 269-98.

- Sordillo, L., Nickerson, S., Akers, R.M. (1989) Pathology of *S. aureus* mastitis during lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function. *J. Dairy Sci.* 77:228-236.
- Sordillo, L.; Nickerson, S. (1988) Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.* 49:1112-1119.
- Sordillo, L.M.; Babiuk, L.A. (1991a) Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon-gamma. *Vet. Microbiol.* 28:189-198.
- Sordillo, L.M.; Babiuk, L.A. (1991b) Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following *in vitro* exposure to recombinant bovine interferon gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:393-402.
- Sordillo, L.M.; Nickerson, S.C.; Akers, R.M.; Oliver, S.P. (1987) Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int. J. Biochem.* 19:1165-1170.
- Sordillo, L.M.; Oliver, S.P.; Guidry, A.J.; Dermody, T.J. (1988) Humoral immune response of bovine mammary gland colonized with *Corynebacterium bovis*: enumeration of plasma cell populations in tissue and immunoglobulin concentrations in milk. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 35:617-627.
- Sordillo, L.M.; Pighetti, G.M.; Davis, M.R. (1995) Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49:263-270.
- Sordillo, L.M.; Redmond, M.J.; Campos, M.; Warren, L. Babiuk, L.A. (1991) Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period. *Can. J. Vet. Res.* 55:298-301.
- Sordillo, L.M.; Shafer-Weaver, K.; De Rosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80:1851-1865.

- Sordillo, L.M.; Streicher, K.L. (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol.* 7:135-146.
- Sorensen, J.T.; Enevoldsen, C. (1991). Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 74:1277-1283.
- Spiegel, M.R. (1991) Probabilidad y estadística. Editorial McGraw Hill, Buenos Aires.
- Strange, F.; Li, S.; Saurer, A.; Burkhardt, Friis, R.R. (1992) Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development.* 115:49-58.
- Sugarman, B.J.; Aggarwal, B.B.; Hass, P.E.; Figari, I.S.; Palladino, M.A. (1985) Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science.* 230:943-945.
- Sunwoo, H.H.; Nakano, T.; Dixon, W.T.; Sim, J.S. (1996) Immune responses in chickens against lipopolysaccharide on *Escherichia coli* and *Salmonella tiphimurium*. *Poult. Sci.* 75:342-345.
- Takahashi, H.; Komatsu, T.; Hodate, K.; Horino, R.; Yokomizo, Y. (2004) Effect of intramammary injection of RbIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and *Staphylococcus aureus* in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis. *J. Vet. Med. B.* 52:32-37.
- Takeda, K.; Iwamoto, S.; Sugimoto, H.; Takuma, T.; Kawatani, N.; Noda, M.; Masaki, A.; Morise, H.; Arimura, H.; Konno, K. (1986) Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. *Nature.* 323:338-340.
- Tatarczuch, L.; Philip, C.; Lee, C.S. (1997) Involution of the sheep mammary gland. *J. Anat.* 190:405-416.

- Tatarczuch, L.; Philip, C.; Lee, C.S. (2000) Leucocyte phenotypes in involuting and fully involuted mammary glandular tissues and secretions of sheep. *J. Anat.* 196:313-326.
- Taylor, B.C.; Dellinger, J.D.; Cullor, J.S.; Scott, J.L. (1994). Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8C. *Cell. Immunol.* 156:245-253.
- Taylor, B.C.; Keefe, R.G.; Dellinger, J.D.; Nakamura, Y.; Cullor, J.S.; Stott, J.L. (1997) T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunol.* 182:68-76.
- Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science.* 281:1312-1316.
- Tonner, E.; Barber, M.C.; Travers, M.T.; Logan, A.; Flint, D.J. (1997) Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein-5 production in the involuting mammary gland of the rat. *Endocrinology.* 138:5101-5107.
- Tonner, E.; Quarrie, L.; Travers, M.; Barber, M.; Logan, A.; Wilde, C.; Flint, D. (1995) Does an IGF-binding protein (IGFBP) present in involuting rat mammary gland regulate apoptosis? *Prog. Growth Factor. Res.* 6:409-414.
- Travers, M.T.; Barber, M.C.; Tonner, E.; Quarrie, L.H.; Wilde, C.J.; Flint, D.J. (1996) The role of prolactin, and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: Relationships to milk synthesis and secretion. *Endocrinology.* 137:1530-1539.
- Treece, J.M.; Morese, G.E.; Llevy, C. (1966) Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 49:1240.
- Turner, J.D.; Huynh, H.T. (1991) Role of tissue remodeling in mammary epithelial cell proliferation and morphogenesis. *J Dairy Sci.* 74:2801-2807.
- Tzianabos, A.O. (2000) Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:523-533.

- Vandeputte-Van Messom, G.; Burvenich, C.; Roets, E.; Devriese, L.; Haesebrouck, F. (1995) Effects of *Staphylococcus aureus* mastitis after endotoxin application on milk yield and composition during subsequent lactation of Guinea pigs. J. Vet. Med. B. 42:118-126.
- Vandeputte-Van Messom, G.; Burvenich, C.; Roets, E.; Massart-Leen, A.M.; Heyneman, R.; Kremer, W.D.J; Brand, A. (1993) Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. J. Dairy Res. 60:19-29.
- Van Kampend, C.; Mallard, B.A. (1997) Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. Vet. Immunol. Immunopathol. 59:79-91.
- Varela, L.; Darcy, K.; Ip, M. (1997) The epidermal growth factor receptor is not required for tumor necrosis factor action in normal mammary epithelial cells. Endocrinology. 138:3891-3900.
- Varela, L.; Ip, M. (1996) Tumor necrosis factor- α a multifunctional regulator of mammary gland development. Endocrinology. 137:4915-4924.
- Verma, J.M.; Rao, M.; Amelem, S; Krzych, U; Alving, C.R.; Green, S.J.; Wassef, N.M. (1992) Adjuvant effects of liposomas containing lipid A: enhancement of liposomal antigen presentation and recruitment of macrophages. Infect Immun. 60:2438-2444.
- Vivekananda, J., A. Lin, J.J. Coalson, and R.J. King. (1994) Acute inflammatory injury in the lung precipitated by oxidant stress induces fibroblast to synthesize and release transforming growth factor-alpha. J. Biol. Chem. 269:25057-25061.
- Wagstrom, E.A.; Yoon, K.J.; Zimmerman, J.L. (2000) Immune components in porcine mammary secretions. Viral Immunol. 13:383-397.
- Walker, N.I.; Bennet, R.E.; Kerr, J.F.R. (1989) Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. Am. J. Anat. 185:19-32.

- Wall, E.H.; Auchtung, T.L.; Dahl, G.E.; Ellis, S.E.; McFadden, T.B. (2005) Exposure to short day photoperiod during the dry period enhances mammary growth in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:1994-2003.
- Waller, K.P. (2000) Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:231-245.
- Wang, Y.; Zarlenga, D.S.; Paape, M.J.; Dahl, G.E. (2002) Recombinant bovine soluble CD14 sensitizes the mammary gland to lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86:115-124.
- Wareski, P.; Motyl, T.; Ryniewicz, Z.; Orzechowski, A.; Gajkowska, B.; Wojewodzka, U.; Ploszaj, T. (2001) Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat. *Small Rumin Res.* 40:279-289.
- Webel, D.M.; Finck, B.M.; Baker, D.H.; Johnson, R.W. (1997) Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 75:1514-1520.
- Wesson, C.A., J. Deringer, L.E. Liou, K.W. Bayles, G.A. Bohach, and W.R. Trumble. (2000) Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect. Immunity* 68:2998-3001.
- Wesson, C.A., Liou, L.E.; Todd, K.M.; Bohach, G.A.; Trumble, W.R.; Bayles, K.W. (1998) *Staphylococcus aureus* influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 66:5238-5243.
- Wilde, C.J.; Addei, C.V.; Li, P.; Fenig, D.G. (1997) Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution. *Exp. Physiol.* 82:943-953.
- Wilde, C.J.; Addey, C.V.; Bryson, J.M.; Finch, L.M.; Knight, C.H.; Peaker, M. (1998) Autocrine regulation of milk secretion. *Biochem Soc Symp.* 63:81-90.

- Woods, A.; Ellis, C.R. (1994) *Laboratory Histopathology. A Complete Reference*. Longman Group Limited. London. 4.1-1-4.6-6.
- Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.R.; Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.
- Yee, D., S. Paik, G.S. Lebovic, R.R. Marcus, R.E. Favoni, K.J. Cullen, M.E. Lippman, and H. Rosen. (1989) Analysis of insulinlike growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Endocrinology.* 3:509–517.
- Yokomizo, Y.; Mori, Y.; Shimoji, Y.; Shimizu, S.; Sentsui, H.; Kodama, M.; Igarashi, H. (1995) Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-I. *J. Vet. Med. Sci.* 57:299-305.
- Zarkower, A.; Norcross, N.L. (1996) Histological changes in the bovine mammary gland after infusion with *Streptococcus agalactiae* extract. *Cornell Vet.* 56:555-566.
- Zecconi, A. (2000) Present and future of modulation of mammary gland immunity. In: *Proceedings of International Dairy Federation Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland*. (Ed. A. Zecconi) Pp. 397-402.
- Zecconi, A.; Bronzo, V.; Casula, A.; Luzzago, C.; Moroni, P.; Piccinini, R.; Spreafico, G. (1999) Efficacy of a biological response modifier in preventing *Staphylococcus aureus* intramammary infections alter calving. *J. Dairy Sci.* 82:2101-2107.
- Zecconi, A.; Bronzo, V.; Piccinini, R.; Spreafico, G.; Rufo, G. (1994) Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Dairy Res.* 61:271-279.

10. ANEXO 1

PREPARACION DE BUFFER Y SOLUCIONES

1. Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2

Preparación solución stock (PBS 10X):

Na ₂ HPO ₄ (o Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O)	11,4 g 28,75 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (o NaH ₂ PO ₄)	3,3 g 2,54 g
Agua destilada	1.000 ml

Preparación solución de trabajo (PBS 1X):

NaCl	8 g
Solución Stock	100 ml
Completar con agua destilada hasta	1.000 ml

Observación:

Controlar pH y ajustar con NaHO 1N o HCl 1N gota a gota.

2. Buffer Citrato 0,01M, pH 6,00

Preparación solución stock:

Ácido Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ PM 192.13)	19,2 g
Disolver en 500 ml de agua destilada	
Controlar pH y ajustar con NaHO 2N gota a gota.	
Completar con agua destilada hasta	1.000 ml

Preparación solución de trabajo:

Solución Stock	1 volumen (Congelado X 50ml)
Completar con agua destilada hasta	500 ml
Controlar pH	

3. Buffer EDTA 1mM, 0,0 5% Tween 20, pH8.0.

Preparación solución de trabajo:

EDTA	0,37g
Agua destilada	1000ml
(Agitar hasta que se disuelva)	
Ajustar pH a 8.0 con NaOH 1N	
Agregar 0,5 ml de Tween 20	

Almacenamiento:

Solución de trabajo en heladera

4. Solución de Bloqueo para IHQ (Suero Normal de Cabra al 10%)

Preparación solución de trabajo:

Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2	90 ml
Suero Normal de Cabra	10 ml
Azida Sódica	0,1 g
Azul de metileno	trazas hasta lograr un leve color azul