



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR APLICADA
ICIVET-LITORAL (UNL-CONICET)

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

***“ROL DEL SISTEMA INMUNE EN LA INVOLUCIÓN DE
LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA Y SU RELACIÓN
CON LA PERSISTENCIA DE LAS INFECCIONES
INTRAMAMARIAS POR *Staphylococcus aureus*”***

Autora: Lic. Carolina Soledad Andreotti

Directora: Dra. Bibiana Dallard

Co-Director: Dr. Hugo H. Ortega

2016

«La ciencia es una de las formas más elevadas del quehacer espiritual pues está ligada a la actividad creadora del intelecto, forma suprema de nuestra condición humana».

René Gerónimo Favalaro

A...

Dios, mis padres, mis abuelos

Agradezco a...

DIOS, por estar siempre en mi vida, guiándome y acompañándome, mostrándome el camino y sosteniéndome cuando más lo he necesitado... GRACIAS

Mis papás, Carlos y Mercedes, por haber estado siempre conmigo, aconsejándome y apoyándome en todas mis decisiones. Por su tiempo, su compañía,... por todo.

Mi abuela, porque desde siempre me ha dado las fuerzas con sus oraciones, y aunque ya no esté conmigo físicamente, sigue presente en mi corazón.

A mi directora de Doctorado, Dra. Bibiana Dallard, por brindarme la oportunidad de trabajar junto a ella, guiándome y acompañándome día a día, enseñándome con gran paciencia y dedicándome su tiempo.

A mi director de Beca, PhD Luis Calvino, por confiar en mí para realizar este trabajo, por sus consejos oportunos, su enorme predisposición en todo momento y su gran humildad.

A mi codirector, Dr. Hugo Ortega, por brindarme un lugar en el ICiVet-Litoral para realizar esta tesis, y estar a disposición cuando lo necesité.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme la posibilidad de formación doctoral en esta Institución.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las Becas que me permitieron realizar este doctorado en Ciencias Veterinarias.

Al INTA y a los demás laboratorios que conforman el ICiVET-Litoral, por la colaboración prestada.

A la Dra. María Sol Renna brindarme su ayuda, consejos y gran colaboración en la realización de este trabajo.

A la Dra. Celina Baravalle por su apoyo y consejo en todo momento.

A la Dra. Natalia Salvetti, por sus charlas, consejos, apoyo y calidez.

A la Dra. Florencia Rey, por su buena disposición permanente a ayudarme y a aconsejarme.

A mi compañera y amiga Elizabet Pereyra, por haber estado ahí, siempre..., por entenderme y compartir conmigo este camino de esfuerzo.

A mi amiga de casi toda la vida, Valentina Matiller, por haberme ayudado, escuchado y acompañado en todo momento.

A mis compañeras y amigas que ya estaban aquí cuando llegué, y de las que tanto aprendí: Fernanda Rodríguez, Ayelén Amweg, Melisa Velazquez, Carolina Panzani.

A mi compañero Pablo Díaz, con quien ingresé y compartí la instancia tan especial de la escritura de la tesis, por darme aliento y apoyo cuando lo necesité.

A los que fueron llegando año a año, mejorando aún más este maravilloso grupo: Marcelo Zayas, Belkis Marelli, Ma. Eugenia Baravalle, Gustavo Hein, Pablo Siroski y Silvina Adona.

A los que siguieron llegando, los más pequeños: Andrea Duré, Antonela Stassi, Matías Belotti, Sofía Sacco, Camila Beccaría, Natalia Gareis, Emmanuel Ángeli, Emilia Huber, Ulises Notaro, Paula Silvestrini, Belén Peralta; gracias por su alegría, compañía y por su amistad.

A los que pasaron por acá, dejando sus huellas... Natalia Alfaro, Mónica Cadoche, Carolina Gaggiomo, Adrián Perri, Candela Regué, Nicolás Piccioti.

A los chicos del CMC, Carlos Franco, Mauricio Kern y Leandro Neme.

A Mónica, Lorena, y a todas mis amigas del Colegio por el apoyo y el aliento en todo momento.

Gracias al increíble grupo de compañeros y amigos del ICiVET-Litoral, sin los cuales no hubiera podido llegar hasta aquí... los voy a llevar siempre en mi corazón.

Índice General

I.	ABREVIATURAS	I
II.	ÍNDICE DE TABLAS	VII
III.	ÍNDICE DE FIGURAS	IX
IV.	RESUMEN	XVI
V.	ABSTRACT	XVIII
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Estructura de la glándula mamaria bovina	2
1.2	Involución de la glándula mamaria bovina	3
1.3	Procesos de remodelación y apoptosis en la GM bovina durante la involución	7
1.3.1	Remodelación	7
1.3.2	Apoptosis	9
1.4	Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina	12
1.4.1	Defensas anatómicas	14
1.4.2	Reconocimiento del patógeno e iniciación de la respuesta inmune innata	15
1.4.3	Elementos celulares	17
	<i>Contribución del epitelio mamario en la inmunidad</i>	17
	<i>Macrófagos</i>	18
	<i>Células dendríticas</i>	18
	<i>Neutrófilos</i>	19
	<i>Células NK</i>	20
	<i>Linfocitos</i>	21
1.4.4	Factores solubles	24
	<i>Citoquinas y quimioquinas</i>	24

	<i>Lactoferrina</i>	31
	<i>Sistema de complemento</i>	31
	<i>Otras proteínas</i>	32
	<i>Inmunoglobulinas</i>	33
1.5	Rol de las células del sistema inmune durante la involución	33
1.6	Mastitis bovina	34
1.6.1	Generalidades	34
1.6.2	Importancia económica	35
1.6.3	Formas de manifestación	36
1.6.4	Principales causantes de mastitis	38
1.6.5	Prevalencia de patógenos causantes de mastitis bovina	39
1.6.6	Mastitis por <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2	HIPÓTESIS	44
3	OBJETIVOS	46
3.1	General	47
3.2	Específicos	47
4	MATERIALES Y MÉTODOS	48
4.1	Animales y Diseño experimental	49
4.2	Toma y procesamiento de muestras	50
4.2.1	Toma y procesamiento de muestras de tejido mamario	50
4.2.2	Toma y procesamiento de las muestras de secreción mamaria	50
4.3	Calendario de toma de muestras de secreción y tejido mamario	51

4.4	Examen clínico	51
4.5	Examen bacteriológico	51
4.6	Caracterización de la Respuesta Inmune Innata y Adaptativa	52
4.6.1	Imunohistoquímica (IHQ)	52
	<i>Controles de la técnica</i>	53
	<i>Procedimiento general de la técnica de IHQ indirecta</i>	53
4.6.2	Caracterización de la respuesta inmune innata y adaptativa por IHQ: componentes evaluados	57
4.6.3	ELISA sándwich para evaluar citoquinas	58
4.7	Caracterización de la remodelación y de los cambios histomorfométricos	59
4.8	Caracterización de la proliferación celular y apoptosis por IHQ	59
4.9	Detección de apoptosis <i>in situ</i> mediante la técnica de TUNEL	59
4.10	Análisis digital de imágenes	60
4.10.1	Cuantificación del área inmunomarcada	61
4.10.2	Cuantificación del número de células inmunes por unidad de área	61
4.10.3	Cuantificación del porcentaje de células en proliferación (antígenos nucleares)	62
4.10.4	Cuantificación de la apoptosis <i>in situ</i>	63
4.10.5	Balance proliferación/apoptosis	63
4.11	Estudios morfométricos	63
4.12	Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados	63

4.12.1	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	64
4.12.2	Western blot	64
4.13	Caracterización de la capacidad fagocítica de macrófagos <i>in vitro</i>	65
4.14	Análisis estadístico	67
5	RESULTADOS	68
5.1	Caracterización de la respuesta inmune innata	69
5.1.1	<i>Receptores tipo toll (TLR-2 y TLR-4)</i>	69
5.1.2	<i>Monocitos-macrófagos: expresión de CD14</i>	74
5.1.3	<i>Inmunodetección de citoquinas proinflamatorias</i>	76
	<i>TNF-α</i>	76
	<i>IL-1α</i>	78
	<i>IL-6</i>	80
	<i>IL-17</i>	82
5.1.4	Lactoferrina (LF):	85
5.2	Caracterización de la respuesta inmune adaptativa	87
5.2.1	Cuantificación de linfocitos T mediante la expresión de CD2	87
5.2.2	Cuantificación de linfocitos B mediante la expresión de CD79	89
	Conclusiones parciales	92
5.3	Cuantificación de los niveles de citoquinas en secreción mamaria	94
5.3.1	IL-1 β	94
5.3.2	IL-4	95

5.3.3	IL-6	96
	Conclusiones parciales	97
5.4	Expresión de componentes de la subfamilia de TGF-β	98
5.5	Expresión proteica de colágeno I	109
5.6	Evaluación de los cambios morfométricos	112
5.6.1	Área representada por parénquima	112
5.6.2	Área representada por estroma	113
	<i>Área representada por estroma intralobulillar</i>	113
	<i>Área representada por estroma interlobulillar</i>	113
	Conclusiones parciales	115
5.7	Caracterización de la proliferación celular	117
5.7.1	Inmunomarcación para PCNA	117
5.7.2	Inmunomarcación para Ki-67	120
5.8	Proteínas reguladoras de la apoptosis	123
5.8.1	Bcl-2	123
5.8.2	Bax	125
5.8.3	Fas	127
5.8.4	Caspasa-3-activa	129
5.9	TUNEL	131
5.10	Relación proliferación / apoptosis (Ki-67 / TUNEL)	134
	Conclusiones parciales	137
5.11	Evaluación de la capacidad fagocítica de macrófagos	139
	Conclusiones parciales	142

6	DISCUSIÓN	143
6.1	Respuesta inmune innata	144
6.1.1	Receptores tipo toll (TLR-2 y TLR-4)	144
6.1.2	Monocitos macrófagos	146
6.1.3	Cuantificación de citoquinas en tejido mamario y en secreción mamaria	148
6.1.4	Lactoferrina	159
6.2	Respuesta inmune adaptativa	160
6.2.1	Linfocitos T y B	160
6.3	Cambios morfométricos	165
6.4	Proliferación y apoptosis	172
6.5	Capacidad fagocítica de macrófagos	181
7	CONCLUSIÓN	186
8	BIBLIOGRAFÍA	189

Abreviaturas

°C = grados centígrados

μg = microgramos

μl = microlitros

μm = micras

ADN = Ácido desoxirribonucleico

ARN = Ácido ribonucleico

ARNm = Ácido ribonucleico mensajero

ATP = Adenosin trifosfato

Apaf-1 = *Apoptosis protease-activating factor-1*

BCR = Receptor del linfocito B

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA = Albúmina sérica bovina

CCL20 = Quemoquina para leucocitos mononucleares

CD = Cluster de diferenciación

CD = Células dendríticas

CEM = Células epiteliales mamarias

CfB = Factor b del complemento

CMH = Complejo mayor de histocompatibilidad

CMH-I = Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

CMH-II = Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

CPA = Células presentadoras de antígeno

DAB = 3,3-diaminobencidina

dATP = Desoxiadenosina trifosfato

DE = Desvío estándar

DMSO = Dimetil sulfóxido

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA = Ensayo inmunoenzimático

FADD = *Fas-associated protein with death domain*

FasL = Fas ligando

FcR = Receptores Fc

FITC = Isotiocianato de fluoresceína

FSC = Parámetro de tamaño en citometría de flujo

GM = Glándula mamaria

H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno

hs = Horas

ICAMs = Moléculas de adhesión intercelular

IFM = Intensidad de fluorescencia media

Ig = Inmunoglobulinas

IHQ = Inmunohistoquímica

IIM = Infecciones intramamarias

IL = Interleuquinas

INF = Interferón

iNOS = Enzima óxido nítrico sintetasa inducible

KDa = KiloDalton

LAP = Péptido antimicrobiano lingual

Lf = Lactoferrina

LPMN = Leucocitos polimorfonucleares

LPS = Lipopolisacárido

LTA = Ácido lipoteicoico

mA = Miliamperes

MAPK = Proteínas quinasas activadas por mitógenos

mg = Miligramos

MIF = Factor inhibidor de la migración

min = Minutos

ml = Mililitros

MPO = Mieloperoxidasa

MyD88 = Proteína de diferenciación mieloide primaria 88

NaCl = Cloruro de sodio

NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

NF- κ B = Factor de transcripción nuclear-kappa B

NK = *Natural killer*

NKT = Linfocitos T *natural killer*

NET = (*Neutrophil Extracellular Trap*) trampas extracelulares de neutrófilos

O.N. = (*Overnigth*) Toda la noche

OVA = Ovoalbúmina

p = Nivel de significancia

PAGE-SDS = Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

PAMP = (*Pathogen-associated molecular patterns*) Patrones moleculares asociados a patógenos

PARP = Poly (ADP-ribosa) polimerasa

pBMEC = Cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas

PBS = Buffer fosfato salino

PCNA = Antígeno nuclear de proliferación celular

PGN = Peptidoglucanos

PRR = (*Pattern recognition receptors*) Receptores de reconocimiento de patrones

RCS = Recuento de células somáticas

Rpm = Revoluciones por minuto

SBF = Suero Bovino Fetal

SCN = Estafilococos coagulasa negativos

SCV = *Small colony variant*

SSC = Parámetro de complejidad citoplasmática en citometría de flujo

SDS = Dodecilsulfato sódico

T.A. = Temperatura ambiente

TBS = Buffer tris salino

TBS-T = TBS-Tween

TCR = Receptor de células T

TdT = Enzima terminal deoxynucleotidyl transferasa

TGF- β = Factor de crecimiento transformante beta

Th1 = Linfocito T helper tipo 1

Th2 = Linfocito T helper tipo 2

Th17 = Linfocito T helper tipo 17

Treg = Linfocito T regulador

TLR = (*Toll-like receptors*) receptores tipo *toll*

TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

TNF = Factor de necrosis tumoral

TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling*)

UFC = Unidades formadoras de colonias

VDAC-1 = Canal aniónico dependiente de voltaje -1

Índice de Tablas

Tabla.		Pág.
1.	Resumen de los principales componentes de la inmunidad innata y adaptativa.	14
2.	Calendario de toma de muestras de secreción y tejido mamario	51
3.	Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en IHQ, características y condiciones de uso.	55
4.	Condiciones de uso de anticuerpos utilizados en WB.	65

Índice de Figuras

Figura	Pág.
1. Morfología general de la glándula mamaria bovina.	3
2. Fases de la involución de la ubre.	4
3. Defensas anatómicas más importantes en la glándula mamaria bovina que actúan como barrera y defensas celulares y solubles que participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria.	15
4. Colonias y características morfológicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	40
5. Inmunomarcación para TLR-2 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	70
6. Porcentajes de área inmunomarcada para TLR-2 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	71
7. Inmunomarcación para TLR-4 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	72
8. Porcentaje de área inmunomarcada para TLR-4 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	73
9. Western blot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ (anti- TLR-2 y anti-TLR-4) en tejido mamario.	73
10. Monocitos-macrófagos inmunomarcados con anti CD14 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	74
11. Número de monocitos-macrófagos por unidad de área (mm ²) marcados con anti CD14 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	75
12. Inmunomarcación para TNF- α en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	77
13. Porcentaje de área inmunomarcada para TNF- α en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	78

14.	Inmunomarcación para IL-1 α en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	79
15.	Porcentaje de área inmunomarcada para IL-1 α en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	80
16.	Inmunomarcación para IL-6 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	81
17.	Porcentaje de área inmunomarcada para IL-6 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	82
18.	Inmunomarcación para IL-17 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	83
19.	Porcentajes de área inmunomarcada para IL-17 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	84
20.	Western blot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ: anti- TNF- α (A), IL-1 α (B), IL-6 (C) e IL-17 (D) en tejido mamario.	85
21.	Inmunomarcación para Lf en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	86
22.	Porcentaje de área inmunomarcada para Lf en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	87
23.	Inmunomarcación de linfocitos T CD2 positivos en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	88
24.	Número de linfocitos T por unidad de área (mm ²) marcados con CD2 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	89
25.	Inmunomarcación de linfocitos B CD79 positivos en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	90

26.	Número de linfocitos B por unidad de área (mm ²) marcados con CD79 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	91
27.	Medias de las concentraciones de IL-1 β en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados con <i>S. aureus</i> y no infectados a las 0 (muestra pre secado), 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336 y 504 hs luego de la interrupción de la lactancia.	94
28.	Medias de las concentraciones de IL-4 en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados con <i>S. aureus</i> y no infectados a las 0 (muestra pre secado), 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336 y 504 hs luego de la interrupción de la lactancia.	95
29.	Medias de las concentraciones de IL-6 en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados con <i>S. aureus</i> y no infectados a las 0 (muestra pre secado), 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336 y 504 hs luego de la interrupción de la lactancia.	96
30.	Inmunomarcación para TGF- β 1 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	99
31.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	100
32.	Inmunomarcación para TGF- β 2 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	101
33.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	102
34.	Inmunomarcación para TGF- β 3 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	103
35.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	104
36.	Inmunomarcación para TGF- β R1 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	105

37.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β R1 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	106
38.	Inmunomarcación para TGF- β R3 en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	107
39.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β R3 en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	108
40.	Western blot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ (anti- TGF- β 1, 2, 3 y los receptores 1 y 3) en tejido mamario.	109
41.	Imágenes representativas de la inmunomarcación para colágeno I en GM crónicamente infectada con <i>S. aureus</i> (A) y no infectada (B) a los 14 días de la involución.	109
42.	Inmunomarcación para colágeno I en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	110
43.	Porcentaje de área inmunomarcada para colágeno I en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	111
44.	Porcentaje de área representada por parénquima en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	112
45.	Porcentaje de área representada por estroma intralobulillar en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	113
46.	Porcentaje de área representada por el estroma interlobulillar en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	114
47.	Inmunomarcación de células positivas para PCNA en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	118
48.	Porcentajes de proliferación evaluados a través de la expresión nuclear de PCNA en parénquima de GM bovina sana e infectada	119

crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución.

49. Porcentajes de proliferación evaluados a través de la expresión nuclear de PCNA en estroma de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. 120
50. Inmunomarcación de células positivas para Ki-67 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. 121
51. Porcentajes de proliferación evaluados a través de la expresión nuclear de Ki-67 en parénquima de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. 122
52. Porcentajes de proliferación evaluados a través de la expresión nuclear de Ki-67 en estroma de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. 123
53. Inmunomarcación para Bcl-2 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. 124
54. Porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. 125
55. Inmunomarcación para Bax en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. 126
56. Porcentajes de área inmunomarcada para Bax en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. 127
57. Inmunomarcación para Fas en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. 128
58. Porcentajes de área inmunomarcada para Fas en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. 129
59. Inmunomarcación para caspasa-3 activa en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. 130

60.	Porcentajes de área inmunomarcada para caspasa-3-activa en GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	131
61.	Inmunomarcación de células apoptóticas <i>in situ</i> mediante la técnica TUNEL en cuartos de GM infectadas crónicas por <i>S. aureus</i> y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución.	132
62.	Porcentajes de apoptosis <i>in situ</i> evaluados a través de la reactividad de células a la técnica de TUNEL, en parénquima de GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	133
63.	Porcentajes de apoptosis <i>in situ</i> evaluados a través de la reactividad de células a la técnica de TUNEL, en estroma de GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	134
64.	Relación proliferación/apoptosis mediante la razón Ki-67/TUNEL, en parénquima de GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	135
65.	Relación proliferación/apoptosis mediante la razón Ki-67/TUNEL, en estroma de GM bovina sana e infectada crónicamente con <i>S. aureus</i> a los 7, 14 y 21 días de involución.	136
66.	Fagocitosis por macrófagos obtenidos de secreciones mamarias de cuartos infectados con <i>S. aureus</i> y no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución.	139
67.	Porcentajes promedios de macrófagos positivos para FITC en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados por <i>S. aureus</i> y no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución.	140
68.	Promedios de las intensidades de fluorescencia media (IFM) en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados por <i>S. aureus</i> y no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución.	141

Resumen

Staphylococcus aureus es el principal patógeno mayor causante de mastitis bovina en Argentina y el mundo y ocasiona infecciones crónicas que generan importantes pérdidas económicas. El objetivo general de este estudio fue investigar el rol del sistema inmune en la remodelación de la glándula mamaria (GM) bovina durante la involución activa y caracterizar la respuesta inmune en GM libres de infección y crónicamente infectadas con *S. aureus* durante este periodo. Se utilizaron vacas en la etapa final de la lactancia con cuartos libres de infección y crónicamente infectados con *S. aureus*. Se estableció como día 0 el comienzo de la etapa de vaca seca y se tomaron muestras de tejido y secreción mamaria en diferentes periodos hasta el día 21 post secado, determinándose la presencia de diversos componentes del sistema inmune y parámetros asociados a la remodelación mamaria. En tejido mamario se evidenció un efecto significativo de la infección observándose porcentajes de inmunomarcación mayores en cuartos infectados respecto a sanos para diferentes componentes de la inmunidad innata: TLR-2 y -4, IL-1 α , TNF- α , IL-17 y lactoferrina. El número de monocitos-macrófagos, linfocitos T y B fue mayor en cuartos infectados con respecto a sanos observándose un efecto significativo de la infección y del tiempo. En secreción mamaria, los niveles de IL-4, IL-6 e IL-1 β fueron significativamente mayores en cuartos infectados respecto a no infectados durante toda la involución. Los porcentajes de marcación para los componentes de la familia de TGF- β , Bax, Bcl-2, Fas y caspasa-3, así como los de proliferación celular fueron significativamente mayores en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados. Los resultados obtenidos demuestran una respuesta inmune local aumentada y una intensa remodelación del tejido en respuesta a la infección crónica por *S. aureus* durante la involución que resultó ser insuficiente para eliminar al patógeno.

Abstract

Staphylococcus aureus is the most prevalent major pathogen of bovine mastitis both in Argentina and worldwide, causing chronic infections that generate significant economic losses. The main objective of this study was to investigate the role of the immune system in the remodeling of the bovine mammary gland (MG) during active involution, as well as to characterize the immune response in healthy and *S. aureus* chronically infected MG during this period. Non-pregnant cows in late lactation either uninfected or with chronic natural *S. aureus* IMI were included in this study. The beginning of drying off was established as day 0 and tissue samples as well as mammary secretion were taken at different periods until day 21 post drying off, to determine presence of different immune components and parameters associated with mammary remodeling. Regarding mammary tissue a significant effect of infectious status was evidenced, with higher percentages of immunostaining for several components of the innate immunity in infected quarters than healthy: TLR-2 and -4, IL-1 α , TNF- α , IL-17 and lactoferrin. The number of monocytes-macrophages, T and B lymphocytes was higher in infected quarters compared with healthy ones and were significantly affected by infectious status and time of sampling. In mammary secretion levels of IL-4, IL-6 and IL-1 β were significantly higher in infected quarters compared with uninfected ones throughout involution. The percentages of immunostaining for TGF- β family members, Bax, Bcl-2, Fas and caspase-3, as well as cell proliferation were significantly higher in infected quarters compared to healthy ones in all sampling times. These results show an increased local immune response and an intense tissue remodeling in response to *S. aureus* chronic infection during involution that turned out to be insufficient to eliminate the pathogen.

1- Introducción

1.1- Estructura de la glándula mamaria bovina

La ubre bovina está constituida por 4 glándulas mamarias o “cuartos”. Cada cuarto es una unidad funcional en sí misma que opera en forma independiente de las demás. A su vez, cada glándula posee un pezón que se abre al exterior a través de un conducto único.

En cuanto a la histología, la glándula mamaria (GM) bovina es una glándula túbulo-alveolar compuesta, de origen cutáneo. Cada glándula consiste en un epitelio secretor rodeado por un estroma de tejido conectivo subcutáneo con mayor o menor abundancia de tejido adiposo. Los conductos colectores de la glándula desembocan en la superficie de la piel por medio del pezón (Gasque Gómez, 2008).

El sistema colector consiste en conductos ramificados que terminan en conductillos de secreción y, cuando la glándula se encuentra en actividad, en alvéolos. El conjunto de alvéolos conforman un lobulillo y cada alvéolo se separa de sus vecinos por medio de tejido conectivo intralobulillar. A su vez, los lobulillos dentro del tejido conectivo forman lóbulos, los cuales están limitados por tejido conectivo interlobulillar. Cada alvéolo está revestido por una capa de epitelio cúbico simple en el estadio no secretor o de reposo. Células mioepiteliales contráctiles que presentan numerosas prolongaciones, rodean el epitelio de los conductos y los alvéolos, y una membrana basal continua encierra todo el sistema epitelial (Figura 1) (Dellmann, 1994).

El tejido intersticial (estroma) proporciona importante sostén estructural para las unidades secretoras y contiene vasos sanguíneos y linfáticos, y nervios. Rodeando a cada unidad secretora (parénquima) se encuentra una capa de tejido conjuntivo laxo con un extenso plexo de capilares sanguíneos y linfáticos, donde se encuentran frecuentemente plasmocitos y linfocitos.

El tejido conjuntivo que rodea cada lobulillo es denso y contiene conductos interlobulillares, vasos sanguíneos y linfáticos mayores. Numerosos conductos interlobulillares drenan en un conducto lobular o galactóforo que es el único conducto excretor del lóbulo. Varios conductos galactóforos o lobulares drenan en un seno o cisterna glandular, seno lactífero o seno galactóforo. Cada cisterna glandular está ubicada en la base de cada pezón. La cisterna glandular es la encargada de

almacenar leche en los intervalos entre ordeños. La parte final del sistema de los conductos termina en el canal papilar del pezón. Desde la cisterna glandular emerge un conducto ensanchado, que atraviesa longitudinalmente al pezón, denominado seno o cisterna de pezón. Entre la cisterna de la glándula y la del pezón se encuentra un pliegue anular de mucosa, que contiene un círculo venoso, denominado comúnmente roseta de Fürstenberg, que junto con el esfínter del pezón evitan la salida pasiva de leche y la entrada de gérmenes y sustancias extrañas al interior de la GM (Dellmann, 1994; Bragulla y col., 2003) (Figura 1).

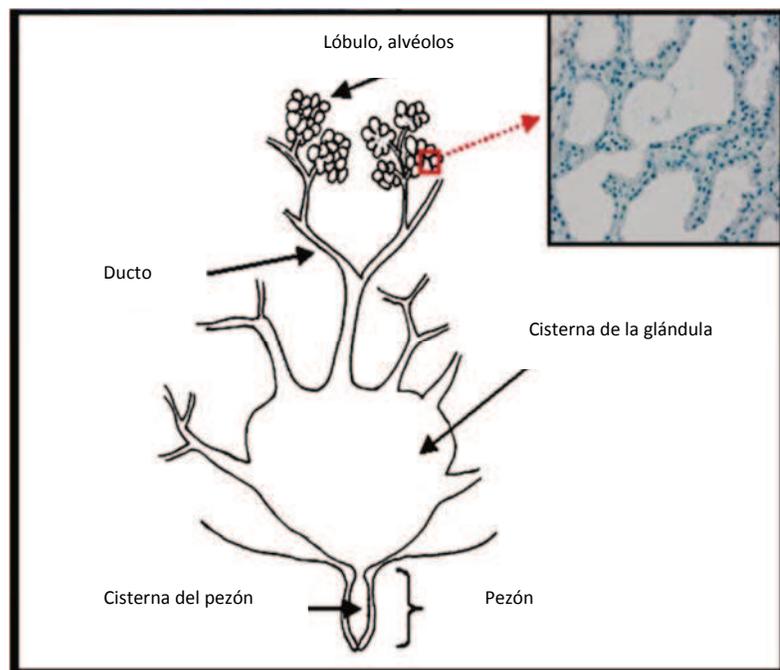


Figura 1: Morfología general de la glándula mamaria bovina. Adaptado de Capuco y Ellis (2005).

1.2- Involución de la glándula mamaria bovina

La GM bovina requiere de un periodo no lactante previo al parto, a fines de optimizar la producción de leche en la lactancia siguiente. Dicho periodo se conoce con el nombre de involución mamaria o “periodo seco”. La fisiología de la GM en este periodo difiere marcadamente respecto de la presentada durante la lactancia y consta de 3 fases o etapas progresivas diferentes: 1) la **fase de involución activa**, 2)

la fase de involución estable y 3) la fase de lactogénesis y calostrogénesis (Smith y Todhunter, 1982) (Figura 2).

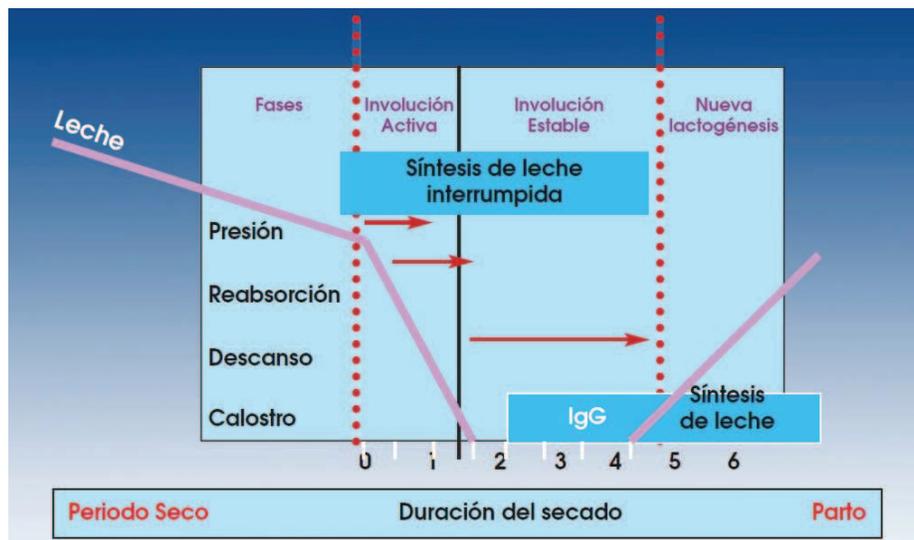


Figura 2: Fases de la involución de la ubre. Extraído y adaptado de Timón y col. (2007).

La involución es un proceso mediante el cual el tejido glandular mamario se somete a una amplia remodelación que implica la muerte celular coordinada, degradación de la matriz extracelular y la regeneración del tejido adiposo (Campbell y col., 2014). Los cambios producidos en la composición de la secreción son producto de los cambios acontecidos en la fisiología de las células epiteliales alveolares. Se producen entonces cambios tanto histológicos como ultraestructurales, así como mecanismos autofagocíticos que devendrán en la disminución de la producción láctea (Hurley, 1989).

La fase de **involución activa** comienza con el cese de la lactancia y dura aproximadamente entre 21 y 28 días (Sordillo y Nickerson, 1988). Si bien este periodo de transición funcional de estado lactante a no lactante es necesario para maximizar la subsecuente producción de leche, la GM muestra una susceptibilidad aumentada a adquirir nuevas infecciones intramamarias (IIM) en esta fase (Oliver y Sordillo, 1988).

Durante este periodo la glándula sigue produciendo leche, lo cual induce un incremento en la presión intramamaria. Al mismo tiempo, el cese del ordeño determina que no se elimine regularmente el contenido de la glándula y se

interrumpe el proceso de arrastre que ejerce la salida de la leche para su desinfección (Smith y Todhunter, 1982).

Estos hechos se ven acompañados además por otros cambios tanto a nivel anatómico como fisiológico:

- Cambios anatómicos en el pezón: ensanchamiento y acortamiento debido al aumento de la presión intramamaria, lo que facilita la entrada de bacterias, puesto que el tapón de queratina está recién comenzando a constituirse.
- Progresiva pérdida de actividad de las células alveolares secretoras, con la consecuente reducción de la secreción láctea.
- Apoptosis y autofagia (Zarzynska y Motyl, 2008) de las células secretoras.

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

- Incremento en la concentración de neutrófilos y macrófagos, encargados de la remoción de células epiteliales dañadas, restos de leche, grasa y caseína; lo cual compromete la capacidad fagocítica de estas células para hacer frente a los microorganismos patógenos.
- Elevadas concentraciones de citrato.
- Aumento progresivo del nivel de Lactoferrina (Lf).
- Disminución de la síntesis de grasa, lactosa y caseína.

La Lf constituye uno de los mecanismos de defensa inespecíficos en la GM en involución, relacionadas con su alta afinidad de unión al hierro. Este elemento constituye un nutriente necesario para el crecimiento de numerosas bacterias patógenas, las cuales, de invadir la GM, deberán competir con la Lf por su disponibilidad (Smith y Todhunter, 1982). En esta etapa, los niveles de Lf se hallan disminuidos, motivo que favorece el desarrollo bacteriano debido a su libre disponibilidad de hierro.

Seguidamente se inicia la **involución estable**. Durante este periodo se sella el canal del pezón con un tapón de queratina, el volumen de la secreción mamaria es mantenido a niveles de sólo unos pocos ml, mientras que sus principales constituyentes se reducen a mínimas concentraciones (lactosa y citrato se encuentran a concentraciones menores a 5 mg/ml y 0.2 mg/ml respectivamente). La proporción

molar citrato/Lf se mantienen a 100 veces por debajo de los encontrados durante la lactancia, mientras que las concentraciones de inmunoglobulinas (Ig) y Lf se hallan elevadas. En cuanto a los elementos celulares, en animales libres de IIM, predominan los linfocitos, gran número de macrófagos y en menor medida neutrófilos (Smith y Todhunter, 1982). La duración de esta fase puede ser variable y estudios recientes indican que se puede reducir al mínimo (Timón y col., 2007). Su extensión aumentará o disminuirá de acuerdo a la duración total del periodo seco, en contraste con las restantes fases, cuya duración se ve controlada por procesos hormonales y eventos de manejo. Si el periodo seco presenta una duración menor a 40 días, el tejido que se encuentra transitando la etapa de involución activa, iniciará simultáneamente la fase de desarrollo a tejido secretor, lo cual podría contribuir a una disminución en la producción de leche en la siguiente lactancia (Smith y Todhunter, 1982).

La última fase es la de **calostrogénesis**, comienza dos semanas antes del parto y es el periodo en el cual la glándula se prepara para producir y almacenar calostro. Se produce un aumento del volumen de la GM, las células alveolares se incrementan en número y en actividad, mientras que el flujo sanguíneo aumenta considerablemente, lo cual puede provocar edemas mamarios.

Nuevamente se incrementan los niveles de citrato mientras que decrecen los de Lf a 2-3 mg/ml en calostro. Como resultado se modifica la relación molar citrato/Lf, incrementándose alrededor de 100 veces en los días próximos al parto, lo cual se traduce en una pérdida de las propiedades antimicrobianas de la Lf. Por otro lado se incrementan las concentraciones de Ig, en especial IgG₁. Los macrófagos predominan sobre otros tipos celulares, aunque su capacidad fagocítica, al igual que la de los neutrófilos se ve disminuida. Se eleva la concentración de grasa, lactosa y caseína, favoreciendo el desarrollo bacteriano. El conducto del pezón también se dilata y acorta debido a la mayor presión intramamaria, facilitando así el acceso de patógenos al interior de la glándula. Por lo tanto, en este periodo se incrementa la susceptibilidad de la GM a nuevas IIM causadas por bacterias patógenas y ambientales (Smith y Todhunter, 1982).

En relación a la duración del periodo de secado en vacas en lactancia se han realizado numerosos estudios, demostrando que un periodo de secado de 40 a 60

días de duración, promueve la proliferación de las células epiteliales mamarias para maximizar la producción y composición de leche en la próxima lactancia (Capuco y col., 1997; Kuhn y col., 2005; Sawa y col., 2012; Cermakova y col., 2014).

1.3- Procesos de remodelación y apoptosis en la GM bovina durante la involución

1.3.1- Remodelación

Durante el periodo seco la GM atraviesa un importante proceso de remodelación, tanto en la involución temprana como en la mamogénesis (Capuco y Akers, 1999). Se produce una significativa renovación y reemplazo de células epiteliales senescentes, así como cambios en la composición del estroma intralobulillar, en especial durante la mamogénesis (Capuco y col., 1997; Sorensen y col., 2006; Annen y col., 2007; De Vries y col., 2010). Estudios previos en modelos murinos, han demostrado que la composición del estroma es importante en la regulación del destino de las células epiteliales mamarias (Silberstein y col., 1992; Farrelly y col., 1999). En este sentido, estudios en cultivos de células epiteliales mamarias (CEM) bovinas, ha demostrado que la composición de la matriz extracelular regula la diferenciación de las células progenitoras en un fenotipo secretor (Holland y col., 2007).

Los factores transformantes del crecimiento-beta (TGF- β) son miembros de una gran superfamilia de proteínas que incluye entre otras, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, así como también activinas e inhibinas (Kingsley, 1994). Existen antecedentes sobre la expresión de varios de los miembros de esta superfamilia en diversos estadios del desarrollo mamario (Phippard y col., 1996; Jeruss y col., 2003; Manickam y col., 2008); sin embargo, las diferentes isoformas de TGF- β y sus receptores, han sido los miembros más extensamente estudiados durante la involución de la GM, destacando su importancia funcional en el proceso de remodelación normal (Plath y col., 1997; Plaut y col., 2003; Zarzynska y col., 2007; Flanders y Wakefield, 2009; De Vries y col., 2010, 2011).

Los mamíferos expresan tres isoformas altamente homólogas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), las cuales comparten 70 % de su secuencia en la región C-terminal biológicamente activa, todas se unen al mismo complejo receptor y activan las mismas cascadas de señalización. La mayoría de las células expresan una o más de las tres isoformas de TGF- β , siendo el TGF- β 1 la isoforma más abundante e intensamente estudiada. Los efectos de TGF- β están mediados por tres receptores específicos de la superficie celular (TGF- β R1, TGF- β R2 y TGF- β R3) presentes en la mayoría de los tipos celulares. Los receptores tipo 1 y 2 están directamente involucrados en la transducción de señales, mientras que el tipo 3 favorecería la unión de los TGF- β a los otros dos subtipos de receptores (Flanders y Wakefield, 2009).

Se ha demostrado que TGF- β regula un amplio espectro de actividades biológicas, que incluyen: crecimiento y diferenciación celular, apoptosis, migración celular, funciones inmunes, angiogénesis y producción de matriz extracelular (Feng y Derynck, 2005; Massague y Gomis, 2006). En la GM TGF- β regula el crecimiento ductal y el desarrollo mediante su efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular y su efecto estimulador sobre fibroblastos y otras células estromales (Daniel y col., 2001). Además, en cuanto a su rol en el desarrollo de la GM, se ha demostrado que suprime la respuesta inmune e inflamatoria, aunque también se le han atribuido ciertas propiedades proinflamatorias (Letterio y Roberts, 1998; Ashcroft, 1999; Flanders y Wakefield, 2009).

Se ha demostrado que TGF- β 1 cumple un rol importante en la inhibición de la proliferación de las CEM y en la modulación de la plasticidad epitelial (Ewan y col., 2005). Constituye un agente apoptogénico para CEM de origen murino (Motyl y col., 2000) y bovino (Gajewska y col., 2004) e induce la apoptosis a través de la acción de la caspasa-3 y M-calpaína (Kulik y col., 1997). La regulación de este proceso, a través de la vía mitocondrial, depende de la interacción entre la proteína proapoptótica Bax y un canal aniónico dependiente de voltaje -1 (VDAC-1).

La apoptosis es una de las funciones biológicas de TGF- β más estudiada durante la involución según los trabajos realizados por Nguyen y Pollard (2000). Dada la conocida capacidad de inducir apoptosis en varios tipos celulares *in vitro*

(Sánchez-Capelo, 2005) sería razonable proponer que el aumento de las diferentes isoformas de TGF- β y de sus receptores, podrían jugar un rol crítico en la inducción de la apoptosis de las células epiteliales durante la involución en GM bovina. Por otra parte, numerosos estudios han caracterizado la expresión de las interleuquinas (IL) proinflamatorias clásicas IL-1 β , IL-8 y factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- α) en mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos (Riollet y col., 2001; Bannerman y col.,2004; Bannerman, 2009; Dallard y col.,2009; Schukken y col.,2011); sin embargo, poco se conoce aún acerca de los cambios en la expresión de otras citoquinas, incluyendo los componentes de la subfamilia TGF- β , durante las IIM por este microorganismo.

1.3.2- Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico en el cual estímulos del desarrollo o ambientales activan un programa genético para llevar a cabo una serie específica de eventos que culminan en la muerte celular, sin alteraciones de la arquitectura o de la fisiología tisular (Hockenbery, 1995). Es una forma de muerte celular adenosin trifosfato (ATP) dependiente, caracterizada morfológicamente por la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y disminución del tamaño de la célula (Granville y col., 1998; Reed, 2000). Los productos de la degradación del ácido desoxiribonucleico (ADN) en fragmentos oligonucleosomales, generan un característico patrón en escalera en electroforesis de geles de agarosa, por lo cual esta característica ha sido extensamente utilizada para detectar apoptosis. Posteriormente, el desarrollo de otras técnicas, como la de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling*), han permitido la marcación enzimática de la ruptura de las cadenas de ADN y la detección de apoptosis en los tejidos (Gavrieli y col., 1992).

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 como macrófagos (Sladek y Rysanek, 2000), o por las células sanas adyacentes del parénquima, que seguidamente, migran o proliferan reemplazando así el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida (Cohen, 1993).

En contraste con la apoptosis, la muerte por necrosis es un proceso independiente de energía que implica un aumento de tamaño de la célula y de sus orgánulos intracelulares, con lo que ésta pierde la integridad de la membrana, alterándose la regulación de la homeostasis iónica. El proceso culmina con la ruptura de la membrana plasmática y la consecuente liberación al espacio extracelular de su contenido intracelular y disolución de los orgánulos, lo que convierte a la célula en una masa de desechos. A diferencia de la apoptosis, la necrosis produce una respuesta inflamatoria localizada que puede causar un mayor daño al tejido (Majno y Joris, 1995, Reed, 2000).

Existen dos caminos principales que conducen la apoptosis: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La primera de ellas implica a la participación de las mitocondrias y puede ser desencadenada por estresores intracelulares tales como los oxidantes. La mitocondria libera citocromo-c, el cual participa en la formación del apoptosoma, que junto a la molécula adaptadora Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*), resultan en el reclutamiento y activación de la caspasa-9, requiriendo para esto dATP o ATP. Posteriormente la caspasa-9 activa las procaspasas -3 y -7, siendo estas caspasas efectoras las responsables del clivaje de varias proteínas que llevan a la morfología y bioquímica de la apoptosis (Yin y col., 2000).

Por otro lado, la vía extrínseca es inducida por la activación de receptores de muerte localizados en la superficie celular. La proteína transmembrana Fas, también conocida como APO-1 o CD95, es miembro de la superfamilia de receptores de TNF y es capaz de mediar la muerte por apoptosis en varios tipos celulares (Kikuchi y col., 2014). La unión de los ligandos al complejo de receptores de muerte recluta a la molécula adaptadora FADD (*Fas-associated protein with death domain*) y activa a la caspasa-8. Un estudio reciente ha demostrado que *S. aureus* induce apoptosis en cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas (pBMEC) a través del receptor de muerte Fas-FADD y seguidamente la señalización dependiente de caspasa-8 (Hu y col., 2014).

Uno de los principales reguladores de la apoptosis, a través de la vía mitocondrial, es la familia de las proteínas Bcl-2 (Reed, 1997). Se sabe que miembros de esta familia están implicados en la regulación de la apoptosis y pueden actuar

tanto como promotores o inhibidores de muerte (Andres y Strange, 1999). Esta familia incluye proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y proapoptóticas como Bax (Colitti y col., 2012). La acumulación de Bax en organelas membranosas precede la activación de la caspasa-3, efectora de la apoptosis (Zhang y col., 1998).

La variación en la expresión de la red de proteínas anti y proapoptóticas así como en los eventos de señalización involucrados en la apoptosis celular en la GM bovina no ha sido completamente estudiada hasta el momento. En un estudio previo realizado por Dallard y col. (2008), se ha demostrado un incremento en la expresión proteica de Bax y caspasa-3 activa en tejido mamario proveniente de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* durante la involución, sugiriendo que la vía dependiente de las caspasas está implicada en los procesos de apoptosis en este tejido.

Los mecanismos involucrados en el daño ocasionado al tejido mamario por las IIM no han sido totalmente esclarecidos, pero incluyen tanto apoptosis como necrosis. Estos dos tipos de muerte celular difieren en cuanto a los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que producen en las células destinadas a morir (Fink y Cookson, 2005). Estudios recientes han demostrado que tanto los factores de virulencia de las bacterias invasoras como las reacciones inmunes del hospedador contribuyen al daño del tejido mamario (Zhao y Lacasse, 2008).

En el caso de las IIM por *S. aureus*, la inducción de apoptosis por este patógeno puede generar daño en el tejido mamario, comprometer la respuesta inmune antimicrobiana y de este modo facilitar la propagación bacteriana (Genestier y col., 2005; Zhao y Lacasse, 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que *S. aureus* induce apoptosis en neutrófilos (Sladek y col., 2005; Genestier y col., 2005), linfocitos (Slama y col., 2009), macrófagos (Krzyminska y col., 2012) y CEM bovinas (Bayles y col., 1998; Hu y col., 2014). Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos de muerte de las células mamarias *in situ*, en vacas crónicamente infectadas con *S. aureus* (Dallard y col., 2008).

Finalmente, la remodelación de la GM depende de un dinámico equilibrio entre procesos de mitosis y apoptosis. Estudios previos han cuantificado la renovación celular en GM no infectadas (Capuco y col., 2002; Sorensen y col., 2006;

Norgaard y col., 2008) y en GM infectadas con *S. aureus*, utilizando diferentes marcadores (Dallard y col., 2008) de proliferación celular *in situ*. Dallard y col. (2007, 2008) demostraron que la proliferación celular, determinada por la inmunomarcación de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y Ki-67, se vio incrementada en células epiteliales y estromales en cuartos infectados crónicamente con *S. aureus*, comparados con cuartos no infectados, durante la involución temprana de la GM bovina.

1.4- Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina

Los mecanismos de la respuesta inmune en la GM bovina involucran diversos factores físicos, celulares y moleculares asociados a este tejido que se engloban dentro de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Ambos mecanismos de respuesta interactúan en forma coordinada en un intento de proporcionar protección contra los microorganismos causantes de mastitis.

En primer lugar, la respuesta inmune innata estimula a la respuesta inmune adquirida e influencia su naturaleza. En segundo lugar, la respuesta adaptativa utiliza varios de los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata para eliminar a los microorganismos, y dicha acción frecuentemente incrementa la actividad antimicrobiana de esta última respuesta. Por lo tanto, de la eficiencia de esta relación dependerá la resistencia a nuevas infecciones (Sordillo y col., 2002; Burvenich y col., 2003; Rainard y Riollet, 2006; Schukken y col., 2011).

La **inmunidad innata**, que representa la primera línea de defensa durante las etapas tempranas de la interacción con el microorganismo, cumple un papel determinante en el establecimiento, progresión y gravedad de la infección, así como en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Aitken y col., 2011). Algunos mecanismos de defensa innatos preexisten en la GM, mientras que otros son inducidos y se activan rápidamente después de la exposición al microorganismo y sus productos (Wellnitz y Bruckmaier, 2012).

La inmunidad innata está mediada por macrófagos, células dendríticas (CD), neutrófilos, células asesinas naturales o *natural killer* (NK) y ciertos factores solubles.

A pesar de que esta respuesta involucra mecanismos que no son antígeno-específicos, no debe entenderse como una respuesta no específica, ya que presenta especificidad molecular (Vivier y Malissen, 2005). La inmunidad innata existe previamente al encuentro del patógeno y se activa rápidamente en el sitio de infección por numerosos estímulos, pero no aumenta con la exposición repetida al mismo antígeno. La acción de la respuesta innata está formada por 2 tipos de componentes; los residentes, que están presentes en la escena y son inducidos cuando el patógeno ingresa, y aquellos que deben mobilizarse hacia el órgano específico donde se desarrolla la infección. La unión entre estas defensas innatas es mediada por la inflamación, por lo que, cuando las defensas residentes no son suficientes para contener o erradicar la infección, las defensas sistémicas son reclutadas (Rainard y Riollet, 2006). Si los mecanismos de defensa innata funcionan adecuadamente, muchos patógenos son eliminados rápidamente dentro de un periodo de tiempo corto y antes de 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 disminución de la producción (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, y 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, la respuesta de memoria puede ser mucho más rápida, considerablemente más fuerte, más duradera y, con frecuencia, más efectiva en remover o eliminar al patógeno (Sordillo y Streicher, 2002; Schukken y col., 2011). Está mediada por linfocitos B que sintetizan anticuerpos, y por linfocitos T que actúan en forma directa o a través de la síntesis de factores solubles.

En la Tabla 1 se resumen los componentes principales y características de la respuesta inmune innata y adaptativa.

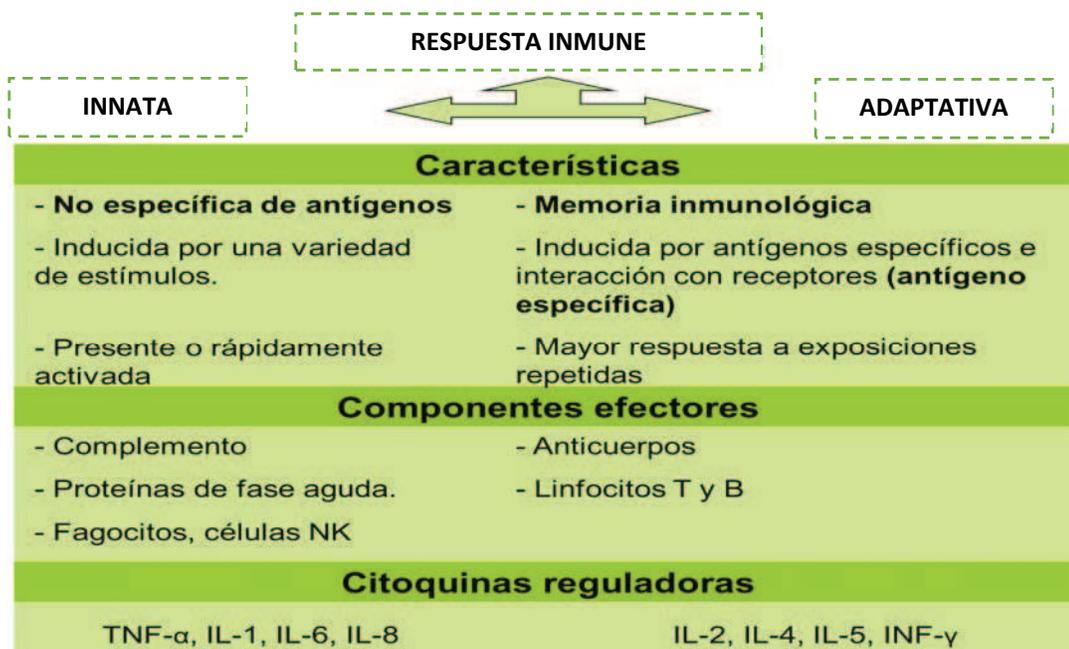


Tabla 1: Resumen de los principales componentes y características de la respuesta inmune innata y adaptativa.

1.4.1- Defensas anatómicas

El canal del pezón es la primera línea de defensa, ya que constituye la ruta a través de la cual ingresan los patógenos a la GM (Figura 3). El pezón contiene un esfínter muscular que mantiene cerrado el canal entre ordeños aislando el interior de la GM. Por lo tanto, una falla en su estructura podría relacionarse con un incremento en la incidencia de mastitis.

El canal del pezón está recubierto con queratina, la cual provee una barrera física adicional, previniendo la migración bacteriana al interior de la cisterna de la GM. Ácidos grasos esterificados y no esterificados (mirístico, palmitoleico, y linoleico) funcionan como bacteriostáticos y se asocian con la queratina. Así también, proteínas catiónicas asociadas con queratina pueden unirse a microorganismos patógenos causantes de mastitis, incrementando su susceptibilidad a cambios osmóticos (Oviedo-Boyso y col., 2007).

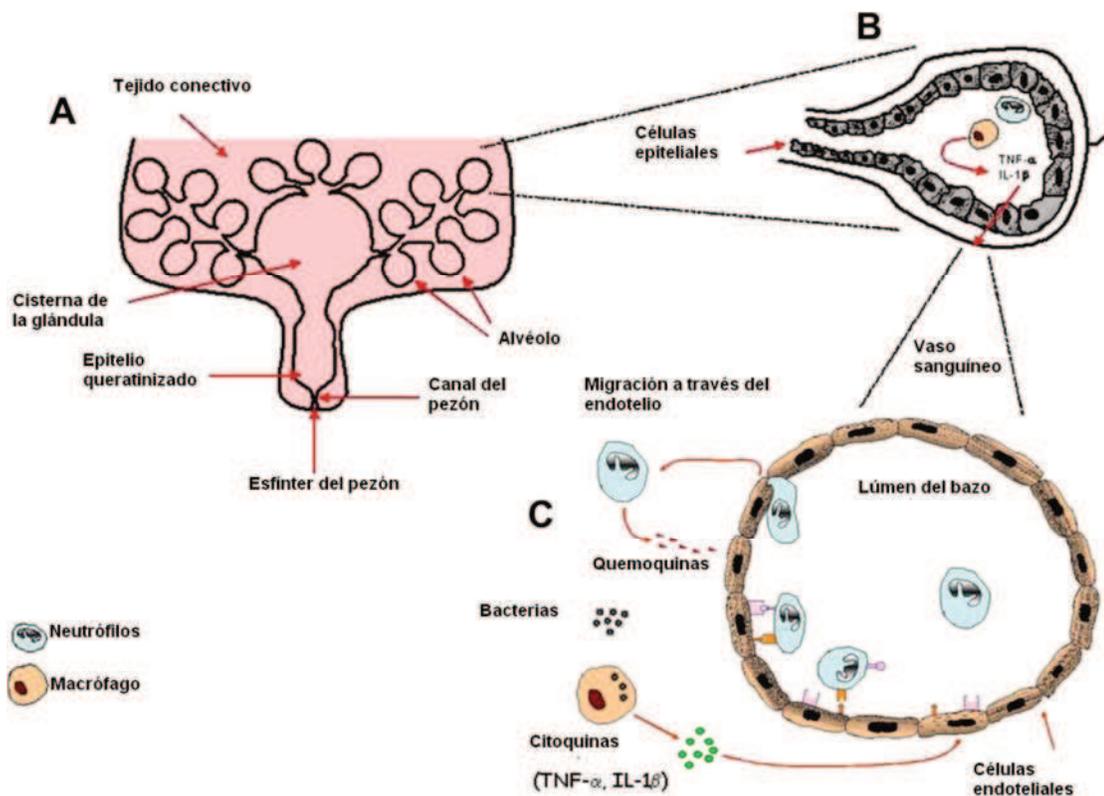


Figura 3: A. Esquema que muestra las defensas anatómicas más importantes en la glándula mamaria bovina que actúan como barrera. B. Defensas celulares y solubles que participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria. Los macrófagos localizados en los alvéolos mamarios fagocitan bacterias localizadas en la cisterna de la glándula. Estos macrófagos activados liberan citoquinas como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleuquina-1beta (IL-1 β). C. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos adyacentes a los alvéolos expresan moléculas de adhesión en respuesta a citoquinas proinflamatorias, esto, de hecho, facilita el reclutamiento de neutrófilos provenientes del flujo sanguíneo al sitio de infección para eliminar bacterias invasoras. Asimismo, las células epiteliales mamarias (CEM) presentan funciones de reconocimiento de patógenos. (Adaptado de Oviedo-Boysó y col., 2007).

1.4.2-Reconocimiento del patógeno e iniciación de la respuesta inmune innata

El contacto entre las bacterias que ingresan a la GM tanto con las células del sistema inmune presentes en la leche como con las células epiteliales que recubren los conductos excretores, desencadena la inducción de la respuesta inmune innata, la cual constituye la primera línea de defensa contra los patógenos causantes de mastitis (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Una respuesta inmune rápida y efectiva se basa en el reconocimiento precoz de los patógenos potenciales (Akira y col., 2006). La respuesta inmune innata se inicia cuando receptores de reconocimiento de patrones (PRR: *pattern recognition receptors*) específicos, en la superficie o dentro de las células

del hospedador, se unen a moléculas particulares de las bacterias, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP: *pathogen-associated molecular patterns*). Estos patrones moleculares constituyen un conjunto de moléculas conservadas y compartidas por grupos diversos de microorganismos y están presentes en su superficie o se liberan cuando los mismos se replican o degradan (Takeda y Akira, 2005). Los PRR son expresados por los leucocitos de la leche y por las células epiteliales que recubren la GM (Strandberg y col., 2005).

Los receptores tipo *toll* (TLR: *toll-like receptors*) forman parte de los PRR, son proteínas estructuralmente relacionadas que reconocen diferentes PAMP e inducen la producción de factores secretados como citoquinas (Akira y col., 2006). En bovinos, en los últimos años, se han descrito las secuencias de 10 TLR (Werling y col., 2006). Los receptores TLR2 y TLR4 están involucrados en forma significativa en infecciones bacterianas, activándose principalmente en respuesta a las IIM con bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente (Takeda y Akira, 2005). La unión del ligando al TLR estimula la activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) y quinasas activadas por mitógenos (MAPK) conduciendo a la producción de importantes mediadores de la inmunidad innata, tales como IL-6, IL-12, IL-18, interferón (IFN)- α e IFN- γ . Concomitantemente, la señalización por TLR induce moléculas coestimuladoras esenciales para la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, como B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), las cuales son proteínas de superficie expresadas por células presentadoras de antígeno (CPA). La presencia de estas moléculas coestimuladoras y la presentación de los componentes antigénicos microbianos activan las células T CD4⁺ requeridas para iniciar la respuesta inmune adaptativa (Takeda y Akira, 2005).

Todas las vías de transducción de señales de TLR activan finalmente el NF- κ B (Akira y Takeda, 2004). La vía dependiente de MyD88 (proteína de diferenciación mieloide primaria) se asocia con la fase de respuesta temprana de NF- κ B, mientras que la vía independiente de MyD88 se asocia con la fase de respuesta tardía de NF- κ B (Günther y col., 2011). La producción de mediadores cuya transcripción ocurre tras la activación de NF- κ B juega un rol crítico en la respuesta inmune de la GM frente a las infecciones. Se ha determinado que la expresión de citoquinas durante la

mastitis bovina se correlaciona con la activación de NF- κ B (Yang y col., 2008; Lara-Zárate y col., 2011) y que la magnitud y duración de la respuesta de citoquinas en las IIM depende del patógeno actuante (Bannerman, 2009). En general, las bacterias Gram negativas que expresan lipopolisacárido (LPS) en su superficie, como los organismos coliformes, inducen una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias rápida y de mayor magnitud que las bacterias Gram positivas como *S. aureus* (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Estas diferencias explican en parte, por qué las bacterias coliformes causan generalmente mastitis agudas con signos clínicos, que pueden ser de moderados a severos; mientras que *S. aureus* causa mastitis que pueden comenzar con episodios agudos o subagudos, que generalmente evolucionan hacia la cronicidad con signos clínicos escasos o ausentes.

1.4.3- Elementos celulares

Si las bacterias son capaces de atravesar el esfínter del pezón y penetrar en el canal del mismo, la segunda línea de defensa consiste en las células del sistema inmune innato y adaptativo, como macrófagos, CD, neutrófilos y linfocitos, así como las CEM (Figura 3). El número y actividad de las poblaciones leucocitarias juega un rol vital en la determinación de la severidad y duración de las IIM (Sordillo y Streicher, 2002).

Contribución del epitelio mamario en la inmunidad:

Las CEM que revisten el canal del pezón, la cisterna de la glándula y los alvéolos constituyen en conjunto las primeras células que reconocen a los patógenos y participan en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria en la GM. Expresan PRR y principalmente TLR (Alva-Murillo y col., 2012). En respuesta a una estimulación bacteriana las CEM secretan moléculas efectoras y mediadores inflamatorios de la inmunidad innata. Se observó que pueden secretar IL-8, y otros componentes de defensa como defensinas, metabolitos de ácido araquidónico y Lf entre otras (Rinaldi y col., 2010, Smolenski y col., 2011, Alva-Murillo y col., 2012, Wellnitz y col., 2012, Ezzat Alnakip y col., 2014).

Macrófagos:

Son derivados de monocitos de la sangre y se diferencian dentro de la GM. Son las células predominantes en la leche (35-79%) (Paape y col., 2003), y en los tejidos de GM sana durante la involución y la lactancia (Ezzat Alnakip y col., 2014). Durante las IIM los macrófagos están implicados en múltiples niveles y son indispensables para el reconocimiento y eliminación de las bacterias causantes de mastitis. Las funciones de los macrófagos en el sistema de defensa innato consisten en fagocitar las bacterias y destruirlas con proteasas y especies reactivas de oxígeno. Más allá de la actividad como fagocitos profesionales, la habilidad de los macrófagos para secretar sustancias que faciliten la migración y actividad de otros tipos celulares, sería la de mayor importancia en la respuesta innata de la GM (Sordillo y Streicher, 2002). De hecho, cuando los macrófagos reconocen bacterias, disparan la liberación de prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 β y TNF- α , que aumentan el proceso inflamatorio local y favorecen la actividad bactericida de los neutrófilos. Los macrófagos también juegan un rol en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa a través del procesamiento y presentación de antígenos en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II (Sordillo y Streicher, 2002). La actividad fagocítica de los macrófagos puede incrementarse en presencia de anticuerpos opsonicos. En el ganado vacuno, los macrófagos de la GM expresan receptores para IgG1 e IgG2 (Grant y col., 1996). A diferencia de los neutrófilos, los macrófagos poseen menos receptores Fc, lo que disminuye su capacidad de fagocitosis (Sordillo, 2005). Los macrófagos de GM son menos eficaces para la fagocitosis en comparación con los monocitos de sangre, porque realizan una ingestión indiscriminada de componentes de la leche (Denis y col., 2006, Ezzat Alnakip y col., 2014).

Células dendríticas:

Entre las CPA se destacan las CD, los macrófagos y los linfocitos B. Las CD son consideradas células profesionales en el procesamiento y presentación antigénica. Se encuentran distribuidas por todo el organismo, en especial debajo de las superficies mucosas, teniendo en cuenta que más del 90% de las infecciones ocurren por esta vía.

De acuerdo a la naturaleza del antígeno y dependiendo del momento fisiológico en que se encuentra el animal presentarán el antígeno en combinación con el CMH-I o en unión al CMH-II. Si toma el primer camino (CMH-I) predominará la respuesta inmunitaria de base celular con secreción de citoquinas: IL-2, IL-12 e IFN- γ) y proliferación de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Por el contrario, si la partícula antigénica es presentada en combinación con el CMH-II, predominará la secreción de IL-4, IL-5 e IL-6, con proliferación de linfocitos B, producción de inmunoglobulinas y respuesta inmunitaria de base humoral (Hope y col., 2003).

Neutrófilos:

Los neutrófilos, constituyen la segunda línea de defensa contra las IIM y representan un 3-26% de las células con función antimicrobiana (Paape y col., 2000). Incluso en GM saludables, estas células se encuentran permanentemente presentes en su interior, aunque en un muy bajo número, y se ha demostrado que el estímulo del ordeño acompañado por la remoción de la leche induce directamente la migración de nuevos neutrófilos al tejido mamario (Paape y Guidry 1969).

Los neutrófilos bovinos atraviesan el epitelio de la GM por diapédesis sin causar daño a las células epiteliales (Lin y col., 1995) a menos que la migración sea extensa, en cuyo caso tanto el daño mecánico como químico son posibles (Akers y col., 2011). Constituyen la primera célula inmune reclutada al sitio de infección (Mehrzaad y col., 2010). Los neutrófilos poseen una membrana con un número de receptores funcionalmente importantes: 1- moléculas de adhesión L-selectina y β 2-integrina, que promueven la unión a células endoteliales para facilitar su migración hacia el foco de infección y 2- receptor de la porción Fc de las inmunoglobulinas IgG2 e IgM y para C3b y iC3b (Ezzat Alnakip y col., 2014). Estos receptores median la primera función que cumplen los neutrófilos en la GM, que es fagocitar al microorganismo (Rainard y Riollat, 2006).

Otra función de los neutrófilos es contribuir a la modulación de la permeabilidad vascular y permitir la llegada de mediadores inflamatorios que juegan un rol crucial en la coordinación entre la inmunidad innata y adaptativa (Sordillo y col., 2002). Los neutrófilos eliminan al patógeno principalmente por fagocitosis y

muerte intracelular empleando numerosos mecanismos antibacterianos: formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, del inglés *Neutrophil Extracellular Trap*), estallido respiratorio, péptidos antibacterianos y defensinas. Los neutrófilos activados liberan el material nuclear y el contenido de sus gránulos de manera similar a una red (NET), que físicamente atrapa bacterias. Estas trampas contienen al patógeno y lo ubican en un entorno local con altas concentraciones de agentes antimicrobianos liberados por los neutrófilos, lo cual aumenta las posibilidades de muerte de la bacteria (Brinkmann y col., 2004). Las funciones fagocíticas y el estallido oxidativo de los neutrófilos se reducen drásticamente cuando toman contacto con la leche, debido a la ingestión de grasa y caseína (Mehrzaad y col., 2005). Sin embargo, las funciones alternativas de los neutrófilos tales como la liberación de NET, no parecen verse afectadas por la presencia de leche (Lippolis y col., 2006). Por lo tanto, los NET podrían constituir importantes mecanismos bactericidas empleados por los neutrófilos durante las IIM (Lippolis y col., 2006).

Los neutrófilos en leche se renuevan frente a estímulos como la lactación. Sin embargo, se observó que la fagocitosis de grasa de la leche, produce una alteración de los gránulos citoplasmáticos disminuyendo su actividad bactericida (Paape y col., 2002). También se observó que la fagocitosis de glóbulos de grasa, lleva a su degradación y generación de radicales hidroxilos, lo que puede dañar el epitelio mamario y de este modo alterar la actividad sintética de la GM contribuyendo a las pérdidas de producción en caso de IIM (Ezzat Alnakip y col., 2014). Luego de cumplir con sus funciones, sufren apoptosis y son eliminados por macrófagos (Paape y col., 2002; Paape y col., 2003).

Células NK:

Las células NK son linfocitos de gran tamaño y de forma granular que poseen actividades citotóxicas independientes del CMH, utilizando 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 destruyen la célula blanco por disrupción de la membrana celular.

Si bien los neutrófilos y macrófagos están muy bien preparados para encontrar y eliminar los patógenos extracelulares, las células NK son críticas al momento de eliminar patógenos intracelulares (Rainard y Riollot, 2006). Además, las células NK son capaces de eliminar bacterias Gram negativas y Gram positivas lo que les confiere importancia en la prevención de ambos tipos de IIM (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996; Rainard y Riollot, 2006).

Linfocitos:

Si la bacteria invasora de la GM sobrevive, la infiltración de neutrófilos es reemplazada, luego de un corto periodo, por linfocitos T y B. Los linfocitos pueden reconocer una amplia variedad de estructuras antigénicas a través de receptores de membrana que definen la especificidad, diversidad y las características de memoria del sistema inmune.

Los **linfocitos T** reconocen los componentes antigénicos a través de receptores de membrana y son los responsables de la regulación y efectividad de la respuesta inmunitaria (Janeway y col., 2001). Del total de linfocitos sanguíneos, la subpoblación de células T es la predominante en los rumiantes, llegando a representar hasta un 80% del total (Tizard, 2000).

Los linfocitos T pueden ser divididos en dos grandes poblaciones, dependiendo de la expresión de marcadores de superficie y del tipo de citoquina secretada: los linfocitos $\alpha\beta$, los cuales a su vez pueden ser subdivididos en T *helper* o colaboradores (CD4+) y T citotóxicos/supresores (CD8+), y los linfocitos $\gamma\delta$. El predominio de alguna de estas subpoblaciones dependerá de factores disímiles tales como estado productivo del animal o características del substrato antigénico, pudiéndose así afectar la implementación de una adecuada respuesta inmunitaria y por consiguiente la salud general del animal (Meglia, 2007). En la GM bovina sana predominan los linfocitos T $\alpha\beta$ que expresan el fenotipo CD8+ fundamentalmente, en contraste con los de sangre periférica que expresan primariamente el fenotipo CD4+ (Asai y col., 1998). En el tejido glandular mamario de animales sanos, los linfocitos T CD4+ se localizan en la porción interalveolar, mientras que los linfocitos T CD8+ se encuentran principalmente rodeando a los alvéolos (Leitner y col., 2003).

Durante la mastitis, prevalecen los **linfocitos T CD4+** que son activados en respuesta al reconocimiento de los complejos antígenos CMH-II en las CPA, como linfocitos B o macrófagos. Cuando un linfocito T CD4+ madura, puede diferenciarse hacia, al menos, 4 fenotipos de células Th, caracterizados según sus factores de transcripción, perfiles de citoquinas y funciones efectoras en: células Th1 (respuesta citotóxica pro-inflamatoria, productoras de IFN- γ e IL-2), Th2 (respuesta humoral mediada por células B, productoras de IL-4, IL-5 e IL-13), Th17 (respuesta mediada por neutrófilos, productoras de IL-17 e IL-22) y Treg (respuesta regulatoria, productoras de IL-10) (Zhu y col., 2010). Durante el parto, las células CD4+ expresan menos IFN- γ e IL-2 y aumentan la expresión de IL-4, IL-5 e IL-10, en comparación con las células CD4+ obtenidas sobre el final de la lactancia (Shafer-Weaver y col., 1999). Estas observaciones sugieren que la activación linfocitaria hacia una vía Th2, tendría influencia sobre la respuesta inmune frente al patógeno y la susceptibilidad a IIM presentada en el parto; aunque dicho mecanismo no ha sido aún confirmado.

Los **linfocitos T CD8+** poseen funciones tanto citotóxicas como supresoras, y por lo tanto pueden eliminar células del hospedador que expresen antígenos extraños (en asociación con el CMH-I) o pueden controlar o modular la respuesta inmune durante la infección bacteriana. Se ha sugerido que las células T CD8+ citotóxicas pueden actuar como “depuradores” (*scavengers*) removiendo células secretoras viejas o dañadas, las cuales pueden incrementar la susceptibilidad de la GM a las infecciones (Taylor y col., 1994). La evaluación de secreciones lácteas de GM bovinas infectadas con *S. aureus* revela una subpoblación de linfocitos T CD8+ activados que son capaces de alterar o suprimir la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+ (Park y col., 1993). Los roles inmuno-regulatorios de los linfocitos T CD8+ también dependen del estadio de la lactancia. En un estudio realizado con células de sangre periférica de vacas lecheras, se observó que linfocitos T CD8+ obtenidos en la mitad de la lactancia exhibían actividades citotóxicas y expresaban IFN- γ , mientras que los obtenidos durante el periodo post-parto temprano no presentaban actividad citotóxica y expresaban principalmente IL-4 (Shafer-Weaver y Sordillo, 1997). La predominancia del fenotipo supresor de las células CD8+ en el

periparto, podría ser una de las razones que expliquen el incremento de la incidencia de IIM en dicho momento.

Durante las IIM causadas por *S. aureus*, se produce un incremento en ambos tipos de linfocitos. Cuando la infección ya se ha establecido, predomina el reclutamiento de linfocitos CD8+, lo que sugiere que este tipo de linfocitos desempeña una importante función en mastitis crónicas causadas por *S. aureus* (Riollet y col., 2001; Rivas y col., 2002; Grönlund y col., 2006; Oviedo-Boyso y col., 2007).

Las **células T γ δ** no han sido bien caracterizadas, pero se sugiere que tendrían capacidad citotóxica, lo que las convertiría en una importante línea de defensa contra agentes infecciosos, particularmente patógenos intracelulares (Skyberg y col., 2011). Soltys y Quin (1999) mostraron un aumento de estas células en sangre durante IIM estafilocócicas. Tanto en humanos como en bovinos, se ha propuesto que las interacciones que desencadenan la activación de las células T γ δ serían independientes de CMH y dependientes del Receptor de células T (TCR). Además, estas células podrían ser directamente activadas por PAMPs en ausencia de CPA, lo cual tendría implicancia en la respuesta inmune innata (Plattner y Hostetter, 2011). La contribución de las variaciones de los linfocitos T γ δ en la inmunidad global de la GM no está del todo clara, debido a que las funciones biológicas de estas células son aún especulativas.

El principal rol de los **linfocitos B** es el de producir anticuerpos contra patógenos invasores. A diferencia de los macrófagos y neutrófilos, los linfocitos B utilizan los receptores de membrana para reconocer antígenos específicos (Sordillo y col., 1997). De manera similar a los macrófagos y CD, estos linfocitos pueden funcionar como CPA. Los linfocitos B internalizan, procesan y presentan el antígeno en el contexto del CMH-II a los linfocitos T CD4+. 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 constantes durante la lactancia (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996).

1.4.4-Factores solubles

Existen factores solubles tanto específicos como no específicos, los cuales representan una línea de defensa de suma importancia para la GM bovina. Dichos factores pueden participar en una respuesta protectora efectiva contra la invasión por parte de patógenos.

Citoquinas y quimioquinas:

El papel de las citoquinas y quimioquinas en la GM se ha estudiado intensamente en los últimos años. No sólo juegan un papel importante en la fisiología sino en los aspectos de la inflamación y la inmunidad. Sin embargo, a pesar de su rol fundamental en la respuesta del hospedador a la infección, también pueden generar efectos deletéreos sobre el mismo. Por lo tanto, existe un fino balance entre los efectos positivos y negativos de las citoquinas en el hospedador, que está establecido por la maduración, cantidad y ubicación de su expresión. La capacidad fisiológica e inmunomoduladora de las citoquinas es compleja, la mayoría tiene vidas medias muy cortas y pueden actuar en forma individual o interactuar con otras (Aitken y col., 2011).

Citoquinas pro-inflamatorias: Las dos citoquinas más importantes que claramente promueven la inflamación son IL-1 β y TNF- α . Estas interleuquinas son mediadores claves de la respuesta inmune sistémica y local. No solo regulan la expresión de una amplia batería de genes incluyendo otras citoquinas, enzimas y proteínas de fase aguda, sino también de genes relacionados con la proliferación y apoptosis. La IL-6 es la tercera citoquina pro-inflamatoria clave que media la respuesta de fase aguda en la inflamación, aunque también puede tener propiedades anti-inflamatorias (Bannerman, 2009).

La ***IL-1*** está relacionada con la estimulación de la respuesta de fase aguda (Tracey, 1994). Ha sido reportado que tiene efectos específicos quimiotácticos y activadores sobre células fagocíticas, además de otros tipos de células (Di Giovine y Duff, 1990; Di Giovine y col., 1991; Dinarello, 1994). Es secretada por distintos 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). Además, se ha demostrado que estimula la producción de varias citoquinas secundarias que actúan amplificando la inflamación como las IL-6 e IL-8 (Cork y Duff, 1994).

Existen dos tipos de IL-1, la IL-1 α e IL-1 β , que poseen una homología de un 25%. Debido a la expresión diferencial de la secuencia señal y el procesamiento proteolítico, la IL-1 α permanece intracelular, mientras que la IL-1 β se secreta. Por esto, se postula que la que la IL-1 α sirve predominantemente para regular los eventos intracelulares y mediar la inflamación local, mientras que la IL-1 β afecta las respuestas locales e inflamatorias sistémicas. La IL-1 α , es producida en grandes cantidades por queratinocitos y en menor medida por macrófagos. En bovinos, la IL-1 β es producida por monocitos/macrófagos y células epiteliales. El rol de la IL-1 β en infecciones causadas por *S. aureus* es importante solo en etapas tempranas de infección (Yamanaka y col., 2000; Zhang e Issekutz, 2002).

Comparada con otras citoquinas, la respuesta de IL-1 β frente a IIM experimentales ha mostrado ser altamente variable (Riollet y col., 2000). En el caso de IIM por bacterias Gram positivas o sin pared celular, la inducción de IL-1 β fue demorada en comparación con la infección por bacterias Gram negativas. Si bien la producción de ARNm de IL-1 β ha mostrado estar regulada positivamente en células de leche aisladas de GM infectadas con *S. aureus* (Riollet y col., 2001), se han observado resultados discordantes en cuanto a la detección de la proteína en leche. Riollet y col. (2000) no detectaron esta citoquina en leche luego del desafío experimental con *S. aureus*; en cambio, Banneman y col. (2004) observaron un aumento en las concentraciones de IL-1 β en leche luego de las 32 horas post desafío con este organismo, manteniéndose por 8 horas adicionales.

TNF- α es producido por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. Esta citoquina participa en la actividad quimiotáctica de los neutrófilos, ya que induce la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales. La rapidez de la liberación de esta citoquina reside en que el TNF- α se acumula como una proteína preformada de 26 kDa (pro-TNF- α) sobre la membrana plasmática y es

clivada rápidamente hasta quedar como una proteína soluble de 17 kDa por una enzima unida a la membrana, la enzima convertidora de TNF- α (TACE) (Solomon y col., 1999; Murray y col., 2005). El TNF- α es la principal citoquina producida durante la etapa de infección temprana y es uno de los responsables del shock endotóxico que se produce en una infección aguda causada por *Escherichia coli*. La infusión intramamaria de TNF- α induce un incremento en el número de células somáticas, principalmente un aumento en la cantidad de neutrófilos (Persson y col., 1996). Al igual que la IL-1, el TNF- α es un poderoso inductor de respuesta inflamatoria, la cual puede mediar directamente o por intermedio de la IL-1 y otras citoquinas proinflamatorias. Así, el TNF- α puede inducir la producción de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1, IL-18 IFN- γ , TGF- β , factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), entre otros. Igualmente, el TNF- α puede estimular la producción de hormonas como el cortisol, la epinefrina, el glucagón, la insulina y la norepinefrina (Tracey, 1994; Dinarello y Moldawer, 1999).

A nivel local, el TNF- α promueve la activación endotelial, el reclutamiento y posterior activación de leucocitos en el sitio de la infección; mientras que los efectos sistémicos incluyen la inducción de fiebre y de proteínas de fase aguda. A pesar de que estos efectos locales y sistémicos son beneficiosos para la respuesta innata del hospedador frente a la infección, el TNF- α está asociado a respuestas inflamatorias agudas que pueden amenazar la vida del animal, cuando ocurren al periparto. Durante la mastitis bovina causada por bacterias Gram negativas se han detectado concentraciones elevadas de esta citoquina en sangre y leche (Riollet y col., 2000; Bannerman y col., 2004) mientras que las bacterias Gram positivas o sin pared celular promueven una respuesta de TNF- α mínima o demorada (Kauf y col., 2007). A pesar de que aún se desconocen las causas de la falta de desarrollo de una respuesta TNF- α temprana en las IIM en bovinos, Kauf y col. (2007), demostraron que el organismo no parecería regular negativamente a esta citoquina, ya que la infusión de LPS en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* indujo una producción de TNF- α en concentraciones comparables con las de las infecciones por bacterias Gram negativas. Respecto de las IIM crónicas por *S. aureus*, se ha observado por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) un incremento significativo del área inmunomarcada para

TNF- α y del número de monocitos/macrófagos CD14⁺ durante la involución mamaria activa, indicando que esta citoquina en asociación con los monocitos/macrófagos tiene una participación destacada en la respuesta inmune durante las IIM persistentes durante el periodo no lactante (Dallard y col., 2009).

IL-6 es una citoquina con propiedades pro- y antiinflamatorias, y está implicada en aspectos que involucran tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, a través de su capacidad para inducir aumento de la temperatura, diferenciación de linfocitos B y la correspondiente producción de Ig, la activación de linfocitos T y el incremento de la respuesta proinflamatoria de los neutrófilos (Keller y col., 1996). Se ha observado una mayor expresión de ARNm de *IL-6* en células somáticas aisladas de leche proveniente de bovinos con mastitis adquiridas en forma natural (Riollet y col., 2001; Taylor y col., 1997) o inducidas experimentalmente en comparación con células aisladas de leche de GM no infectadas. La abundancia relativa de estos transcritos ha sido detectada tanto en vacas infectadas con *E. coli* como con *S. aureus*. Asimismo, se han observado incrementos en las concentraciones de la *IL-6* en leche y sangre de vacas con mastitis adquiridas naturalmente (Hagiwara y col., 2001) e inducidas experimentalmente (Dernfalk y col., 2007).

Estudios *in vitro* en cultivos primarios de CEM sugieren que la respuesta de estas células a *S. aureus* está dominada por la *IL-6* (Günther y col., 2011) y que la rápida y elevada expresión de esta citoquina luego de la estimulación con la bacteria está acompañada de incrementos en las concentraciones de ARNm para IFN- β 1 e IFN- β 2. Se ha demostrado que el IFN- β inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias como la *IL-12* a través de un incremento de la síntesis de *IL-10* en células mononucleares de sangre periférica en seres humanos (Wang y col., 2000) y regularía en forma negativa al IFN- γ reduciendo tanto la expresión de CMH-II sobre las CPA (Huynh y col., 1995) como la expresión de moléculas de adhesión y metalopeptidasas de la matriz (MMPs) (Liuzzi y col., 2004). El desafío de las CEM con *S. aureus* no indujo la expresión de CMH o MMPs ni de moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), lo cual sustenta la teoría propuesta (Günther y col., 2011).

Citoquinas anti-inflamatorias: Las IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β , suprimen la producción de citoquinas inflamatorias. Estas IL se originan a partir de leucocitos que invaden la GM durante la infección.

La **IL-10** es una de las IL anti-inflamatorias más estudiada en la respuesta inmune en la GM. Es producida por varios tipos celulares, incluyendo los linfocitos T helpers de tipo 2, células B, eosinófilos, mastocitos y células de linaje monocítico, éste último es considerado la mayor fuente de esta citoquina *in vivo* (Asadullah y col., 2003). La misma tiene dos funciones principales: limitar la inflamación mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas mediante la disminución de la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Van Crevel y col., 2002) e influenciar la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa a la infección afectando la capacidad de monocitos y macrófagos para presentar antígenos a los linfocitos T por regulación negativa de la expresión de moléculas del CMH-II (Mocellin y col., 2004). Además, la IL-10, también participa en la absorción de antígenos y la diferenciación y función de linfocitos T y B (Bannerman y col., 2004).

Se ha demostrado que la infección experimental con *S. aureus* no induce una respuesta significativa de IL-10 en la GM bovina (Bannerman y col., 2006). Si bien trabajos previos han demostrado la expresión de ARNm para IL-10 en células de leche proveniente de cuartos mamarios con infecciones crónicas por *S. aureus* (Riollet y col., 2001) la estimulación de pBMEC con *S. aureus* no logró aumentar los niveles de ARNm para esta citoquina (Lahouassa y col., 2007), lo cual sugiere que las CEM no serían la fuente de IL-10 en la leche durante la infección por *S. aureus*.

La **IL-4** es una citoquina crítica que favorece el desarrollo de la respuesta celular Th2 (Seder y col., 1992). Los transcriptos de esta citoquina no fueron detectados en leche de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* (Riollet y col., 2001). Por otra parte, la **IL-13** no ha sido explorada en la GM bovina en infecciones por *S. aureus*.

El **TGF- β** , además de sus propiedades anti-inflamatorias, regula un amplio espectro de actividades biológicas que han sido descritas anteriormente en la sección 1.3.1.

Los *IFN* constituyen una familia de citoquinas con funciones inmunes moduladoras. Los IFN de tipo I, como IFN- α e IFN- β , son expresados por todos los tipos de células, mientras que el IFN- γ es producido exclusivamente por los leucocitos y es el más estudiado en la inmunidad de la GM bovina. El IFN- γ promueve la diferenciación de células Th1 y suprime de forma concomitante la actividad de células Th2. Durante el curso de IIM experimentales por *S. aureus* se detectaron incrementos en las concentraciones de IFN- γ en leche y en la expresión cuantitativa de ARNm en células epiteliales, aunque en forma más tardía comparado con la infección por *E. coli* (Riollet y col., 2001; Bannerman y col., 2004; Lee y col., 2006; Kauf y col., 2007). Es interesante destacar que las mayores concentraciones de IFN- γ han sido detectadas en IIM caracterizadas por una persistencia de la infección y que estas elevadas concentraciones coincidieron con un mayor número de bacterias recuperadas de las GM infectadas en comparación con GM no infectadas (Kauf y col., 2007). Esta característica puede reflejar un intento del huésped de intensificar las respuestas inmunes mediadas por células para erradicar los patógenos que no son efectivamente eliminados por los mecanismos de defensa innatos en etapas más tempranas de la infección.

La *IL-17* es una citoquina multifuncional producida por linfocitos activados CD4+ y CD8+, así como linfocitos T $\gamma\delta$ no convencionales estimulados y células NK. La IL-17 induce la expresión de quimioquinas, citocinas proinflamatorias y metaloproteasas, y de este modo la estimulación de la inflamación y la quimiotaxis de neutrófilos (Strzêpa y Szczepanik, 2011). Se ha demostrado que la IL-17A y la IL-17F participan tanto en la inmunidad innata como en la adquirida contra infecciones (Matsuzaki y Umemura, 2007). La interacción entre IL-17 y las bacterias ocurre en la superficie epitelial, donde dicha IL es producida en respuesta a la presencia bacteriana (Matsuzaki y Umemura, 2007; Onishi y Gaffen, 2010). IL-17A e IL-17F activan a las células epiteliales, las cuales producen de esta manera quimioquinas de reclutamiento de neutrófilos y productos antimicrobianos (Kolls y Linden, 2004; Kolls y col., 2008; Bougarn y col., 2011).

Riollet y col. (2006) detectaron ARNm para IL-17 en leucocitos aislados de leche bovina luego del desafío experimental con una proteína de sensibilización

(ovoalbúmina). Por otra parte, Bougarn y col. (2011) demostraron que el receptor para IL-17A e IL-17F es expresado en la GM bovina y que las CEM responden a estas dos citoquinas produciendo quimioquinas y proteínas de auto defensa. Un estudio reciente mostró que las linfoquinas IL-17A, IL-17F e IFN- γ fueron producidas en la GM durante la inflamación antígeno específica y que además la IL-17A fue detectada en leche y en células epiteliales y estromales de la GM bovina (Rainard et al., 2013). En base a estas evidencias, se hipotetiza que IL-17 es una de las citoquinas que modula la respuesta de las CEM a los patógenos, y que esta citoquina jugaría un rol importante en las defensas de la GM contra los patógenos causantes de mastitis como *S. aureus* (Bougarn et al., 2011; Rainard et al., 2013).

Quimioquinas: Las quimioquinas constituyen una gran familia de citoquinas que estimulan la migración de leucocitos desde la sangre al sitio de la inflamación. Mientras el reclutamiento de granulocitos, monocitos, macrófagos y células NK median la eliminación del patógeno, la migración de células T y B inducen la respuesta inmune humoral en la GM. La IL-8 o quimioquina CXCL8 ha sido más estudiada en la GM bovina durante la respuesta inmune. Numerosos trabajos demuestran un significativo aumento en la expresión cuantitativa de ARNm para CXCL8 en el tejido mamario y de la proteína CXCL8 en leche después de la infección con diferentes patógenos causantes de mastitis (Bannerman, 2009). Esta quimioquina interactúa con los receptores de quimioquinas 1 (CXCR1) y CXCR2 para mediar la migración de granulocitos y la acumulación de macrófagos en el sitio de infección. Los neutrófilos constituyen una primera línea de defensa inmune celular y son reclutados tempranamente por CXCL8 en respuesta a la infección (Riollet y col., 2000).

En cuanto al rol de la IL-8 en las IIM por *S. aureus*, estudios realizados con diferentes cepas no han logrado detectar incrementos de IL-8 en leche luego de la infección intramamaria experimental (Riollet y col., 2000). Por otra parte, numerosos trabajos independientes con diferentes cepas de *S. aureus* han mostrado expresión disminuida o ausencia completa de ARNm para IL-8 en tejido mamario y en células de la leche en respuesta a la infección experimental (Lee y col., 2006; Yang y col., 2007).

Lactoferrina (Lf):

La Lf bovina es una glicoproteína de unión al hierro. En el ambiente de la GM es principalmente producida por el epitelio secretor y en menor medida por neutrófilos y macrófagos (Oviedo-Boyso y col., 2007). También se la encuentra en otras secreciones epiteliales y fluidos de barrera (Channeton, 2008). Si bien en el calostro se han detectado altas concentraciones de Lf, ésta aumenta durante la lactancia, y los mayores niveles de la misma se alcanzan en una fase de la involución mamaria. Se ha reportado que su expresión está regulada en forma recíproca con otras proteínas de la leche, y está en relación inversa al desarrollo alveolar (Ezzat Alnakip y col., 2014). En secreciones normales de leche su concentración es de 0.1-0.3 mg/ml, mientras que aumenta marcadamente a lo largo de la involución activa. Su concentración es de 8.5 mg/ml al día 7 de involución, mientras que llega hasta los 20-30 mg/ml hacia el día 30 de este periodo. Este incremento durante el periodo seco está relacionado con la inhibición del crecimiento de ciertos microorganismos que necesitan iones libres de hierro presentes en la leche como factor de crecimiento, lo que previene la incidencia de IIM (Harmon y col., 1976, Kawai y col., 1999). Su efecto bacteriostático se debe a la competición con los microorganismos por la disponibilidad de hierro.

Por otro lado, la Lf cuenta con la habilidad para unirse a las paredes celulares de bacterias Gram negativas, causando la ruptura de su membrana externa (Ellison et al. 1988). Por lo tanto, además de su efecto bacteriostático, la Lf presenta un efecto bactericida (Newman y col., 2009). *S. aureus* es resistente a la acción microbicida de Lf pero es susceptible a la opsonización por C3b y C3bi (Oviedo-Boyso y col., 2007). La principal función de la Lf es entonces proteger a la GM contra infecciones bacterianas en el periodo de involución, junto a la activación de la fagocitosis y del sistema de complemento (Kai y col., 2002; Sordillo y Streicher 2002; Lee y col., 2004).

Sistema de complemento:

El sistema de complemento está presente en suero y leche, y cumple un papel importante dentro de los mecanismos de defensa de la GM contra la mastitis. Las proteínas del complemento son producidas principalmente por hepatocitos, y por algunos monocitos y macrófagos en diferentes tejidos. Las moléculas del

complemento son necesarias, no solo para reclutar neutrófilos a la GM, sino también para opsonizar y eliminar bacterias, de las cuales las Gram negativas son sensibles a su acción lítica, mientras que las Gram positivas (como *S. aureus*) son resistentes; sin embargo todas las bacterias son susceptibles a la acción opsonizante de C3b y C3bi. Las actividades bactericidas y hemolíticas del complemento se ven incrementadas en cuartos inflamados, y la intensidad de dichas actividades está relacionada con la respuesta inflamatoria. Es sabido que la actividad hemolítica y la concentración de C3 en leche son mayores en GM mastíticas respecto a sanas (Korhonen y col., 2000; Barrio y col., 2003; Rainard, 2003).

Otras proteínas:

Otras proteínas y enzimas cumplen un rol en la defensa contra microorganismos como la *transferrina*, una proteína de unión a hierro que llega a la GM sana desde la sangre o a través de la exudación del plasma durante las mastitis (Rainard y Riollet, 2006). La transferrina aportaría una acción bacteriostática frente a los agentes patógenos durante el inicio de la infección (Rainard y Riollet, 2006). La *lisozima* cliva el enlace β 1,4-glicosídico (Rainard y Riollet, 2006) y puede ejercer una acción sinérgica con la Lf sobre la pared celular de los microorganismos (Sordillo y col., 2002). Sin embargo, no es considerada un mecanismo de defensa significativo en la GM (Rainard y Riollet, 2006). La *lactoperoxidasa*, junto a la *xantina oxidasa*, son las enzimas más abundantes en leche (Isobe y col., 2009). Promueven la actividad bactericida de los fagocitos a través de la generación de ROS (Rainard y Riollet, 2006). Puede tener una acción complementaria en la función antimicrobiana con una β -defensina, como por ejemplo el péptido antimicrobiano lingual (LAP) (Isobe y col., 2009). La *mieloperoxidasa* (MPO) es un componente importante del sistema antimicrobiano dependiente de oxígeno de neutrófilos (Cooray y col., 1995). *In vitro*, este sistema ha demostrado ser potente contra los principales agentes patógenos de la GM, tales como *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *E. coli* (Cooray y col., 1995). Las propiedades antibacterianas atribuidas a este sistema sólo son relevantes durante el periodo seco (Ezzat Alnakip y col., 2014).

Inmunoglobulinas:

Los primeros efectores solubles de la respuesta inmune específica son los anticuerpos producidos por linfocitos B activados por antígenos. Existen cuatro clases de Ig conocidas, que influyen en los mecanismos de defensa antibacterianos en la GM: 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 GM. 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 GM (Sordillo y Streicher, 2002).

1.5.- Rol de las células del sistema inmune durante la involución

El rol de las células derivadas del sistema inmune en el desarrollo ductal coordinado de la GM previo a la gestación está bien establecido (Gouon-Evans y col., 2000); sin embargo, el rol preciso de estas células en la regulación de la involución mamaria es menos claro. En las últimas décadas se han publicado numerosos estudios acerca de los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis de las células epiteliales mamarias (Atabai y col., 2007). Sin embargo, queda aún mucho por dilucidar acerca de cómo las células epiteliales son removidas y cómo se regula y coordina el proceso de reclutamiento, retención y eliminación de las células del sistema inmune durante la remodelación.

Estudios realizados en bovinos y ovejas han identificado macrófagos, neutrófilos, linfocitos y una pequeña proporción de CD obtenidas a partir de secreciones mamarias de glándulas en involución (Tatarczuch y col., 2000, 2002; Monks y col., 2002). Estos datos sugieren que la involución está asociada con un aflujo temprano de neutrófilos a la GM seguido por el de macrófagos y linfocitos. Estudios demostraron un incremento significativo de monocitos-macrófagos CD14+ a la inmunomarcación en GM sanas a los 7 días del secado comparados con los días

14 y 21 post secado, localizándose preferentemente en el estroma interalveolar, rodeando las células epiteliales (Dallard y col., 2009).

Estudios previos han implicado a los fagocitos profesionales en el barrido de los componentes de la leche y células epiteliales *in vivo* e *in vitro* (Nickerson y Sordillo, 1985, Tatarczuch y col., 2000). En relación a estos hallazgos se ha sugerido que la capacidad fagocítica de los neutrófilos y macrófagos durante la involución se ve afectada debido a que los mismos están ocupados en la remoción de los componentes de la leche (Dulin y col., 1988). Tatarczuch y col., (2002) en ensayos *in vitro* observaron que la capacidad fagocítica de neutrófilos y macrófagos aislados de secreciones mamarias fue máxima durante la involución tardía coincidiendo con la menor evidencia de componentes citoplasmáticos ingeridos. En forma similar, Paape y col. (1992), han observado que los neutrófilos y macrófagos son menos competentes en la fagocitosis de bacterias *in vitro* cuando son obtenidos en la involución temprana comparando con la involución tardía.

El rol de las células plasmáticas y linfocitos B, las cuales son reclutadas durante la involución tardía, permanece especialmente oscuro. Estudios previos demostraron que a los 7, 14 y 21 días de la involución en tejidos mamarios sanos el número de linfocitos B/mm² inmunomarcados fue similar en los tres periodos evaluados. Por otra parte el número de linfocitos T/mm² fue significativamente mayor al día 7 comparando con los días 14 y 21 del secado (Tumini y col., 2009).

1.6- Mastitis bovina

1.6.1. Generalidades

La mastitis bovina es una inflamación de la GM en respuesta a una agresión local al tejido mamario que puede ser de origen infeccioso, mecánico o tóxico. Sin embargo, la gran mayoría de los casos de mastitis se deben a IIM causadas por microorganismos, principalmente bacterias que invaden la glándula, se desarrollan y generan productos tóxicos perjudiciales para el tejido mamario (Schalm y col., 1971).

La ocurrencia y la intensidad de un caso de mastitis dependen de numerosos factores que están asociados al animal infectado, a la bacteria patógena y al medio ambiente en que ambos se encuentren. El medio ambiente está a su vez determinado

principalmente por las condiciones de manejo que se utilizan. Esta característica multifactorial convierte a la mastitis en un problema complejo que requiere un abordaje multidisciplinario (Reza, 2000; Menzies y Ramanoon, 2001).

Se han descrito más de 140 microorganismos que causan mastitis, incluyendo especies de bacterias, hongos, micoplasmas y algas (Castro y col., 2006). Las infecciones por bacterias invasoras u otros microorganismos (hongos y virus) son las principales causas de la enfermedad (Wattiaux, 2001; Castro y col., 2006).

La inflamación de la GM es inducida cuando los microorganismos patógenos penetran vía el canal del pezón, superando los mecanismos defensivos y multiplicándose en el tejido mamario, dañando el órgano y alterando la composición normal de la leche (Hillerton y Berry, 2005; Castro y col., 2006). Uno de los indicadores más importantes para comprobar el estado de salud de la GM es el recuento de células somáticas (RCS) en leche, que indica la respuesta inflamatoria a una IIM (Castro y col., 2006). Cuanto, mayor es el grado de inflamación que presenta la glándula, aumenta el RCS, lo cual está asociado a una menor calidad y cantidad de leche producida (Bedolla y Ponce De León, 2008).

La constitución anatómica de la ubre, la expone constantemente a lesiones y agentes patológicos de diversos orígenes. El propósito de la respuesta inflamatoria es destruir o neutralizar al agente causal y preparar a la GM para el retorno a su función normal (Philpot y Nickerson, 2000).

1.6.2. Importancia económica

La mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente a la industria lechera (Roussel y col., 2015; Halasa y col., 2009). Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas debido a la disminución en el rendimiento de la leche para el proceso (Wellenberg y col., 2002; Rabello y col., 2005), al aumento en el número de tratamientos de casos clínicos y al desecho temprano de vacas (Saran y Chaffer, 2000; Nash y col., 2003). Además, provoca problemas relacionados con la calidad de la leche y la salud pública, a causa del riesgo de la presencia de residuos en leche por el inadecuado uso de antimicrobianos para el

tratamiento de casos clínicos y a la potencial emergencia de bacterias resistentes (De Vliegher y col., 2012).

A nivel mundial, las pérdidas causadas por mastitis bovina son de aproximadamente 35 mil millones de pesos anuales y representa el 70 % de los gastos totales para los ganaderos lecheros (Philpot y Nickerson, 1992; Dos Santos y col., 2002; Welleberg y col., 2002). Cálculos recientes para los Países Bajos, Suecia y EE.UU. revelaron una pérdida económica estimada por mastitis de \$ US80 a \$ 125 por vaca promedio por establecimiento, en su mayoría causadas por mastitis clínica (Hogeveen y col., 2011).

En Argentina, a pesar del avance en el control de mastitis en los últimos 15 años, la prevalencia de la enfermedad sigue siendo elevada. La media geométrica de los valores de RCS en leche de tanque, sobre un número aproximado de 6.640 tambos, entre agosto de 2012 al mismo mes de 2013, fue de 374.500 cél/ml (MinAgri, 2013). Considerando que las pérdidas económicas, solamente por menor producción, son al menos del 5% del total de leche producida, y teniendo en cuenta que la producción mensual promedio de esos establecimientos lecheros fue de 592 millones de litros se puede estimar en forma conservadora una pérdida anual cercana a los 355,2 millones de litros solamente para esos tambos. Los últimos datos reportados sobre las pérdidas en la producción de leche en tambos de Villa María estimaron las pérdidas por mastitis son $\geq 1,0$ US\$/vaca/día (Vissio y col., 2015), incluyendo gastos por enfermedad, control y prevención.

1.6.3. Formas de manifestación

La mastitis bovina puede clasificarse en clínica y subclínica dependiendo de la presencia de signos evidentes de enfermedad (Dos Santos y col., 2002; Castro y col., 2006) y en crónica, aguda e hiperaguda dependiendo de la persistencia del patógeno y de la severidad con que la ubre reaccione ante el agente infeccioso (Reza, 2000).

A la *mastitis clínica* se la reconoce por su aparición repentina y por los cambios macroscópicos en la GM y/o en la leche (Tollersrud y col., 2000; Gasque Gómez, 2008). La inflamación de la glándula varía de un edema ligero a una inflamación dolorosa, caliente y consistente. La secreción de la leche disminuye y

puede tener apariencia de suero sanguíneo. A menudo se evidencian signos sistémicos, como fiebre, pérdida de apetito, que en algunos casos pueden conducir a la muerte del animal (mastitis clínica hiperaguda). Su severidad varía entre estados agudos y crónicos durante el transcurso de la enfermedad (Wattiaux, 2001).

La *mastitis subclínica* no se reconoce a menos que se realice alguna de las pruebas de campo y laboratorio; como la prueba de Mastitis California, la medición de conductividad eléctrica, el conteo leucocitario en leche, la prueba de Mastitis Wisconsin, pruebas químicas (detección de albúmina, cloro, proteína, lactosa y globulina) y pruebas microbiológicas en muestras de leche (Gasque Gómez, 2008). Dado que la enfermedad transcurre sin provocar una inflamación glandular visible, ni cambios organolépticos de la leche, es difícil detectarla (Castro y col., 2006). Sin embargo, el RCS en la leche se encuentra elevado, al igual que el número de microorganismos. Esto se encuentra acompañado de una disminución del nivel de producción de la secreción láctea, así como de la alteración de la composición de dicho producto (Heringstad y col., 2000).

La reducción en la capacidad de síntesis y secreción de la GM en las mastitis subclínicas es responsable del 70 % (Philpot y Nickerson, 1992) al 75 % (NMC, 1996) del total de las causas de pérdidas; mientras que el resto de las mermas económicas son ocasionadas por la mastitis clínica. Los animales con mastitis subclínica son reservorios de microorganismos patógenos y pueden contagiar a otras vacas sanas y en algunos casos el estado subclínico puede volverse clínico (Wattiaux, 2001; Hillerton y Berry, 2005). Este tipo de manifestación es el que causa mayores perjuicios a los productores lecheros debido a su elevada prevalencia y carencia de signos clínicos, lo que contribuye a que animales sin alteraciones evidentes actúen como reservorios de la enfermedad y contribuyan a la rápida propagación de la bacteria dentro del rodeo (Bradley y col., 2007). Además, según la persistencia de la infección, ésta puede clasificarse en:

Aguda: corto plazo o transitoria, con cura o reversión espontánea de la enfermedad.

Crónica: largo plazo, infección persistente. La etapa terminal consiste en la atrofia de la glándula.

1.6.4. Principales patógenos causantes de mastitis

Como se ha mencionado anteriormente, más de 140 microorganismos diferentes pueden causar mastitis y todos proliferan en el animal o en su entorno. Es por ello que la mastitis se genera como el resultado de la interacción entre el animal, el ambiente y los microorganismos (Philpot y Nickerson, 2000). Dependiendo de su hábitat principal y de su forma de transmisión, las bacterias causantes de mastitis han sido divididas en patógenos contagiosos y ambientales (Bedolla y Castañeda, 2003).

Los *patógenos ambientales* se encuentran en el ambiente donde vive la vaca; pasturas, cama, excremento, entre otros, (Smith y Hogan, 1993) y pasan a la ubre en los periodos entre ordeño. Al no estar adaptados a la GM, algunos de estos patógenos producen respuestas inflamatorias importantes que se traducen en casos de mastitis clínica que suelen durar poco tiempo. Incluyen un grupo heterogéneo donde se encuentran bacterias Gram positivas como *S. dysgalactiae* (Smith y Hogan, 1997), *S. uberis* y los estafilococos coagulasa negativos (SCN) y por otra parte, bacterias Gram negativas representadas principalmente por coliformes (Smith y col., 1985; Oliver, 1988). El reservorio primario de estos patógenos es el ambiente de la vaca, y la exposición de los cuartos no infectados a los patógenos ambientales puede ocurrir en cualquier momento durante la vida del animal (Zadoks, 2002). La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a los rodeos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos basado en higiene y terapia antibiótica (Calvinho y col., 1998).

Los *patógenos contagiosos* viven y se multiplican sobre y dentro de la GM infectada, además se propagan entre cuartos de un mismo animal o de un animal a otro, principalmente durante procedimientos de ordeño poco higiénicos (Zadoks y col., 2001; Rossitto y col., 2002). Este grupo incluye: *S. aureus*, *S. agalactiae*, especies de *Mycoplasma* spp. y *Corynebacterium* spp. (Djabri y col., 2002; Tenhagen y col., 2006; Smulski y col., 2011).

Esta clasificación clásica es de uso muy difundido, aunque la evidencia más reciente sugiere que muchos patógenos ambientales pueden comportarse como

contagiosos y viceversa, aportando un grado más de complejidad al abordaje de esta enfermedad.

1.6.5- Prevalencia de patógenos causantes de mastitis bovina

Si bien la mastitis bovina es causada por numerosos agentes etiológicos, *S. aureus* es considerado el patógeno contagioso más frecuentemente aislado de casos de IIM en las últimas décadas, tanto en Argentina (Calvinho y Tirante, 2005) como en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi y col., 2006). Sin embargo, la implementación de medidas de control de la mastitis causada por los principales patógenos contagiosos (*S. aureus* y *S. agalactiae*) produjo un cambio hacia una mayor prevalencia e incidencia de IIM causadas por patógenos ambientales (SCN, coliformes y *S. uberis*) (Calvinho, 2007; Dieser y col., 2014; Hedge y col., 2012; Kateete y col., 2013; Abrahmsén y col., 2014).

Un estudio reciente estimó la prevalencia de bacterias patógenas causantes de mastitis en muestras de leche de tanque en tambos ubicados en la cuenca lechera central Argentina. Sobre un total de 129 muestras procesadas, el patógeno mayor predominante fue *S. aureus* (42.60%) seguido de *S. uberis*, *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae* con una prevalencia de 27.10%, 10.90% y 4,70%, respectivamente. Un 14.7% de las muestras de leche no se aislaron patógenos mayores (Neder y col., 2014). Además, en la cuenca lechera de Villa María (Córdoba), se ha demostrado recientemente que los patógenos más frecuentemente aislados fueron los SCN (52.1%), seguido por *S. aureus* (21.3%) (Dieser y col., 2014). Se han identificado más de veinte especies de SCN en GM bovina (Taponen y col., 2006; Sampimon y col., 2009; Park y col., 2011; Supré y col., 2011; Bonetto, 2014; Fry y col., 2014) siendo *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus epidermidis* las especies halladas con mayor frecuencia. Históricamente, las especies SCN han sido consideradas como patógenos menores. Esta calificación se basó en que estos patógenos sólo producen una leve inflamación de la GM con bajos incrementos en los RCS, y raramente se asociaban a casos de mastitis clínica. Los SCN son la principal causa de IIM en la mayoría de los establecimientos que han implementado medidas de control frente a los principales patógenos contagiosos. Sin

embargo, los resultados contradictorios sobre aspectos tales como el efecto de las especies de SCN sobre el RCS, la producción de leche, su virulencia y epidemiología, han causado confusión en cuanto a la importancia de los SCN sobre la salud de la GM (Pyörälä y Taponen, 2009; Vanderhaeghen y col., 2014).

1.6.6 Mastitis por *S. aureus*

S. aureus es una bacteria inmóvil Gram positiva, esférica y usualmente agrupada en racimos, anaerobia-aerobia facultativa, no esporulada, catalasa positiva. Esta bacteria produce generalmente la enzima coagulasa, fermenta el manitol u otros azúcares, formando ácido pero no gas (Kloos y col., 1986). Su crecimiento ocurre en un amplio rango de temperaturas (6.5 a 50°C), siendo su temperatura óptima 30-40°C. *S. aureus* tolera altas concentraciones de cloruro de sodio (Figura 4). Se destruye fácilmente por altas temperaturas y por casi todos los agentes desinfectantes, por lo cual la presencia de esta bacteria en alimentos procesados o en equipos indica generalmente higiene deficiente o contaminación post proceso por causa humana (Todar, 2011).

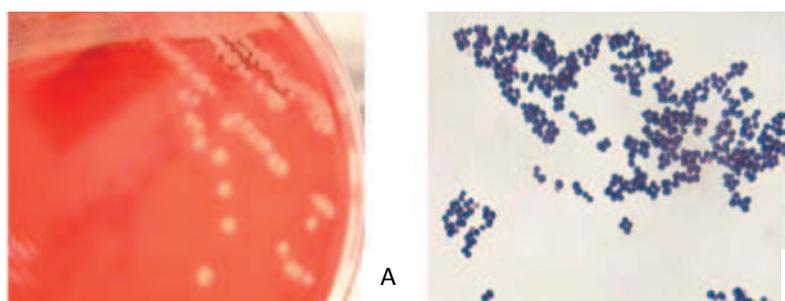


Figura 4: Colonias y características morfológicas de *S. aureus*. (A) Crecimiento de *S. aureus* en placa de agar sangre. Colonias doradas y β -hemolíticas características de *S. aureus*. (B) Tinción de Gram de *S. aureus*. Se observan cocos dispuestos en tétradas y en racimos característicos del género *Staphylococcus*. Adaptado de González (2013).

Aunque *S. aureus* puede causar mastitis aguda y clínica con alteración macroscópica de la leche, la forma más frecuente de presentación es la subclínica con tendencia a la cronicidad, sin alteración macroscópica de la leche, pero con recuentos

elevados de células somáticas y persistencia de las bacterias en la GM (Bardiau y col., 2014).

Debido a que la mayoría de las IIM causadas por *S. aureus* son subclínicas, con frecuencia no son detectadas. Clásicamente, *S. aureus* se ha caracterizado como un patógeno extracelular (Finlay y Cossart, 1997). Sin embargo, un número creciente de estudios ha demostrado la habilidad de *S. aureus* de invadir y sobrevivir dentro de varios tipos celulares del hospedador, incluyendo CEM, neutrófilos y macrófagos (Almeida y col., 1996; Hebert y col., 2000), lo cual contribuye a su persistencia en numerosas enfermedades en animales y seres humanos (Gresham y col., 2000). Estas particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008), tendiendo a producir infecciones crónicas que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario. En este sentido, las mastitis por *S. aureus* producen más daño al tejido mamario que las causadas por otros microorganismos contagiosos y pueden generar disminuciones en la producción láctea hasta de un 45% por cuarto infectado y un 15% por animal (Roberson, 1999).

La infección de la GM ocurre generalmente por vía ascendente. Los microorganismos pasan a través del canal del pezón hacia la cisterna del mismo y pueden en consecuencia establecerse en un área de tejido secretorio (Anderson, 1983). Al comienzo se verán dañadas sólo pequeñas áreas del cuarto afectado, con pérdida funcional de los alvéolos involucrados. Las células epiteliales que revisten los alvéolos y pequeños conductos mamarios degeneran, mueren y son descamadas. Este material, más los leucocitos y la fibrina producen coágulos que bloquean los conductos mayores, impidiendo la remoción de la leche que proviene de áreas aún funcionales. La leche acumulada, conduce a la regresión prematura del tejido secretor dejando como consecuencia leche residual “atrapada” que se transforma en un medio de cultivo ideal para el progreso de la infección. Los conductos cerrados pueden reabrirse, liberando bacterias a otras partes del cuarto infectado. Este proceso se repite una y otra vez en cuestión de días o semanas, perpetuando un ciclo continuo de infecciones en áreas vecinas. Durante los estadios tempranos, el daño tisular es mínimo y generalmente reversible. Si las bacterias sobreviven, los

microabscesos irán aumentando de tamaño hasta hacerse clínicamente palpables. El curso crónico de la mastitis por *S. aureus* implica destrucción de alvéolos, oclusión de conductos galactóforos y regresión del epitelio alveolar, que es reemplazado por tejido fibroso afuncional (Corbellini, 1996; Akers y Nickerson, 2011). Este tipo de infecciones usualmente responden en forma deficiente a los tratamientos antimicrobianos lo que se traduce en graves pérdidas económicas para el productor (Akers y Nickerson, 2011). Estudios *in vitro* han demostrado que *S. aureus* se adhiere a la CEM y a componentes de la matriz extracelular y posteriormente la invade. La adhesión es un requisito previo y un paso temprano crucial para la infección de la GM. *S. aureus* puede escapar del interior del fagosoma al citoplasma de la CEM e inducir la apoptosis (Bayles y col., 1998). En vacas crónicamente infectadas, se ha demostrado la presencia de *S. aureus* viables en el interior de macrófagos y en células alveolares aisladas de leche (Hebert y col., 2000). Por lo tanto, la infección subclínica repetida puede resultar de la existencia intracelular de la bacteria preservada de las defensas del hospedador así como del efecto de los antibióticos.

El desarrollo de la IIM y la respuesta de los tejidos a la presencia de *S. aureus* dependen no solo de la efectividad de los mecanismos de defensa del hospedador sino también del índice de multiplicación del microorganismo y el tipo y concentración de los factores de virulencia bacterianos (Fournier y col., 2008). Estudios recientes han demostrado la asociación entre genotipos y factores de virulencia de *S. aureus* con las manifestaciones clínicas y comportamiento epidemiológico de las IIM causadas por este microorganismo, que ponen en perspectiva atributos que favorecerían la persistencia de las infecciones mamarias (Haveri y col., 2007; 2008; Fournier y col., 2008; Piccinini y col., 2010; 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, las interacciones entre microorganismos, sistema inmune del hospedador y factores ambientales pueden modular el progreso o resolución de la enfermedad (Piccinini y col., 2012).

El patrón de IIM causadas por *S. aureus* difiere frecuentemente entre rodeos y estas diferencias podrían estar relacionadas con distintas características de las cepas (Zecconi y col., 2005; 2006), aunque otros estudios sugieren que solo pocos clones estarían involucradas en el desarrollo de la mastitis bovina (Akineden y col., 2001;

Zecconi y col., 2006, Buzzola y col., 2007). La importancia de evaluar la combinación de factores de virulencia de *S. aureus* se ha enfatizado recientemente tanto en medicina humana como en veterinaria (Haveri y col., 2005; 2007; Le Maréchal y col., 2011; Melchior y col., 2011, Szweda y col., 2012; Bardiau y col., 2014) y los resultados obtenidos avalan la teoría de que el progreso de la IIM hacia la resolución o hacia la cronicidad podría estar relacionado con las características de la cepa y con la expresión de combinaciones específicas de factores de virulencia.

2- Hipótesis

La GM bovina cuenta con una batería de elementos para la defensa contra la entrada y proliferación de los patógenos y la deficiencia en la función de los mismos al inicio del secado, conducen a la persistencia de las infecciones causadas por *S. aureus*.

Si bien se han desarrollado numerosos estudios acerca del rol que desempeña el sistema inmune del huésped y los factores de virulencia bacterianos en la patogenia de las infecciones crónicas por *S. aureus*, son escasos los estudios que se centran en el periodo de involución activa de la GM.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la introducción, queda claro que el sistema inmune desempeña un papel preponderante durante el periodo de involución de la GM bovina por lo que **nuestra hipótesis de trabajo se fundamenta en que se producirá una respuesta inmune diferencial en animales sanos con respecto a los infectados en forma crónica por *S. aureus* en este periodo.**

Consideramos que un mejor entendimiento de los factores que regulan el reclutamiento, retención y eliminación de las células del sistema inmune en la GM durante la involución contribuiría a aclarar los mecanismos que conducen a la cronicidad del proceso infeccioso.

3- Objetivos

En función de la hipótesis planteada y el objetivo general antes mencionado se propone:

3.1- General

Investigar el rol del sistema inmune en la remodelación de la GM bovina durante la involución y caracterizar la respuesta inmune en GM libres de infección y crónicamente infectadas con *S. aureus* durante este periodo.

3.2- Específicos

1) Caracterizar la respuesta inmune innata y adaptativa en tejido mamario sano y con infecciones naturales crónicas por *S. aureus* durante la involución activa.

2) Caracterizar el nivel de citoquinas en secreciones mamarias de cuartos sanos y con infecciones crónicas por *S. aureus* durante la involución activa.

3) Evaluar la expresión proteica de componentes de la subfamilia de TGF- β , los cambios morfométricos del parénquima y estroma mamario y la expresión proteica de colágeno I estableciendo diferencias en cuartos sanos e infectados con *S. aureus*.

4) Caracterizar los inhibidores intramamarios de la proliferación celular e inductores de la apoptosis y proteínas regulatorias intracelulares, estableciendo diferencias en cuartos sanos e infectados con *S. aureus*.

3) "Investigar *in vitro* los cambios en la capacidad fagocítica de macrófagos colectados a partir de secreciones mamarias provenientes de cuartos sanos y de cuartos con infecciones crónicas por *S. aureus* en diferentes estadios de la involución"

4- Materiales y Métodos

4.1- Animales y diseño experimental

Se utilizaron 21 vacas Holando Argentino, no preñadas, en el tercio final de la lactancia (31-36 semanas), pertenecientes al rodeo experimental de la EEA Rafaela (INTA). Se incluyeron animales con similar número de lactancias (3 a 5), ordeñados dos veces al día y con una producción de leche promedio de 12 litros/día antes de la interrupción de la lactancia.

Vacas con un número similar de lactancias fueron incluidas en cada grupo experimental. La evaluación del estado infeccioso de la glándula mamaria se realizó en base procedimientos recomendados por el *National Mastitis Council* (Oliver y col., 2004). El estado infeccioso de los cuartos mamarios fue determinado 6 meses previos al inicio del experimento y confirmado 20 a 3 días previos al cese del ordeño. Las IIM fueron naturalmente adquiridas, durante el periodo de secado o durante los primeros dos meses de la lactancia previos al inicio de este estudio. Las vacas con mastitis por *S. aureus* fueron seleccionadas en base a resultados de recuentos de células somáticas mensuales (RCS > 250x10³ de células/ml) y posterior análisis bacteriológico de la leche de los cuartos mamarios. Un cuarto fue considerado infectado luego del aislamiento de *S. aureus* en dos muestras consecutivas. Los cuartos infectados fueron seleccionados al azar de vacas que hubieran mostrado al menos dos cuartos infectados con *S. aureus*. Sólo se incluyeron animales con IIM subclínicas al momento de la interrupción de la lactancia. Los cuartos no infectados fueron seleccionados de vacas libres de IIM al tiempo de muestreo, con resultados negativos al análisis bacteriológico y RCS menores a 250x10³ células/ml.

De acuerdo con los criterios de selección mencionados, de las 21 vacas disponibles para el estudio, 12 tenían al menos 2 cuartos mamarios infectados y 9 tenían sus cuartos mamarios libres de infección. Las vacas fueron sacrificadas a los 7, 14 y 21 días luego de la interrupción de la lactancia en un matadero local. La unidad experimental fue el cuarto mamario. Cuartos mamarios no infectados (n=8) e infectados con *S. aureus* (n=8) fueron incluidos en cada grupo (7, 14 y 21 días).

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas vigentes sobre experimentación animal: *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research*

and Teaching (2011), y aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral.

4.2- Toma y procesamiento de muestras

4.2.1- Toma y procesamiento de las muestras de tejido mamario

Inmediatamente luego del sacrificio, se tomaron muestras de tejido mamario de tres zonas distintas de la glándula a una profundidad de 4 cm según trabajos previos (Nickerson y col., 1992; Dallard y col., 2010). Zona 1: porción del parénquima mamario adyacente a la cisterna de la glándula, zona 2: porción entre la cisterna de la glándula y el límite dorsal del parénquima mamario, zona 3: porción cercana al límite dorsal del parénquima mamario (zona adyacente al abdomen). Las muestras fueron inmediatamente fijadas en formol bufferado al 4 % durante aproximadamente 8 hs a temperatura ambiente (T.A.). Para su procesamiento mediante técnicas histológicas de rutina, luego de un lavado prolongado en agua corriente y PBS 0,01M pH 7,2, las muestras se deshidrataron en concentraciones graduales crecientes de alcohol etílico, se aclararon en xilol y embebieron en parafina siguiendo protocolos de rutina (Woods y Ellis, 1994). Posteriormente, se confeccionaron los tacos histológicos y se realizaron cortes seriados de aproximadamente 4 μm en un micrótomos rotativo manual y se los dispuso sobre portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Por último los cortes fueron secados a 37°C durante 24 hs y luego almacenados a 4°C hasta su utilización en técnicas histológicas de rutina e IHQ. Paralelamente, se realizó un pool de pequeñas porciones de las distintas zonas del tejido mamario extraído que fueron almacenadas a -80°C para su posterior uso en técnicas de Biología Molecular (PAGE, western blot).

4.2.2- Toma y procesamiento de las muestras de secreción mamaria

Se obtuvieron muestras de secreción mamaria en forma aséptica por 3 días antes de la interrupción de la lactancia, inmediatamente antes del secado (hora 0), a las 12, 24, 48, 72, 96 hs y a las 168 hs (7 días), 336 hs (14 días) y 504 hs (21 días) post secado.

De cada cuarto se obtuvieron 200 ml de secreción mamaria que fueron distribuidas en dos frascos colectores estériles de 100 ml cada. Las muestras fueron conservadas a 4°C e inmediatamente remitidas al laboratorio. Posteriormente, fueron procesadas siguiendo metodologías apropiadas para cultivos bacteriológicos, cuantificación de citoquinas mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) y ensayos de fagocitosis *in vitro*. En el caso de las muestras para ELISA se alicuotaron en tubos eppendorf de 2 ml a -80°C hasta su uso correspondiente. Las muestras para ensayos de fagocitosis fueron procesadas rápidamente para realizar la extracción de mononucleares (el procedimiento se detalla en el punto 4.13).

4.3- Calendario de toma de muestras de secreción y tejido mamario

	1	2	3	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
MUESTRAS DE SECRECIÓN MAMARIA	Controles de secreción cada 24 hs (previos al secado)			0 h Muestra presecado 12 h	Cada 24 hs																						
MUESTRAS DE TEJIDO MAMARIO																											

Día 0: Día del secado de las GM

Tabla 2: Calendario de toma de muestras de secreción y tejido mamario.

4.4- Examen clínico

Se registró la temperatura rectal inmediatamente antes del secado y cada 24 hs post secado 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 fue clasificado arbitrariamente sobre la base del grado de inflamación como: tejido normal, inflamación moderada e inflamación marcada.

4.5- Examen bacteriológico

Se sembraron 10 µl de secreción mamaria en placas de agar suplementado con 5% de sangre bovina, incubándose por 48 hs en forma aeróbica a 37°C. Las placas fueron examinadas a las 24 y 48 hs para detectar desarrollo bacteriano. *S. aureus* fue identificado en base al patrón hemolítico en agar sangre, pruebas de catalasa y

coagulasa. La diferenciación de otros estafilococos coagulasa-positivos, por producción de acetoina y crecimiento selectivo en P agar con 7µg/ml acriflavina (Roberson y col., 1992; Oliver y col., 2004). Otros patógenos causantes de mastitis fueron identificados por metodologías estándar (Oliver y col., 2004). La presencia de una sola colonia de *S. aureus* en el agar sangre fue considerado como positivo, siendo el límite de detección de 100 UFC/ml.

4.6- Caracterización de la respuesta inmune innata y adaptativa

Para caracterizar la respuesta inmune desarrollada durante la involución en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y no infectados, se utilizaron técnicas de IHQ indirecta y ELISA sándwich. Las mismas permitieron evaluar en tejido mamario y en secreción mamaria, respectivamente, diferentes componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa. Para dichos ensayos se utilizaron anticuerpos específicos para cada antígeno. La especificidad de los anticuerpos usados en IHQ se determinó mediante western blot (WB) como se detalla en el punto 4.12.

A continuación se describe el procedimiento general de la técnica de IHQ indirecta. Para cada anticuerpo se presentaron variaciones en cuanto a las concentraciones de uso y recuperación antigénica, entre otros. Dichas especificaciones y los datos de los anticuerpos primarios y secundarios se detallan en la Tabla 3.

4.6.1- IHQ

Para todos los antígenos evaluados se utilizó el método streptavidina-biotina-inmunoperoxidasa, con variantes específicas en el procedimiento según el anticuerpo primario utilizado. Brevemente, las secciones de tejido provenientes de las distintas zonas obtenidas fueron desparafinadas, hidratadas y se les realizó o no recuperación antigénica, dependiendo del anticuerpo primario utilizado. La actividad de la peroxidasa endógena fue inactivada 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, excepto para las inmunomarcaciones con

anti-CD14 y anti TGF- β 1 que fueron incubadas a T.A. Luego de tres lavados en PBS de 5 minutos cada uno, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado a T.A. por 30 minutos, seleccionado específicamente de acuerdo a los diferentes tipos de anticuerpos primarios utilizados (monoclonal o policlonal). A excepción del anticuerpo secundario universal cuya presentación es lista para usar, los anticuerpos secundarios anti ratón y anti conejo se diluyeron en PBS-BSA (1:200). La visualización del antígeno se realizó por el método streptavidina-peroxidasa (BioGenex, San Ramón, CA) utilizándose como cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Por último, los cortes fueron lavados en agua destilada, contracolorados con hematoxilina (Biopur, Bubendorf, Suiza), deshidratados y montados.

Controles de la técnica

Para verificar la especificidad de la técnica utilizada se realizaron diferentes controles: como controles negativos se sustituyó el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario biotinilado por suero no inmune. Para excluir la posibilidad de la no supresión de la actividad de la peroxidasa endógena algunas secciones fueron incubadas solamente con el reactivo DAB.

Cortes histológicos de bazo y de ganglio linfático bovino fueron procesados y tratados con las mismas condiciones enumeradas en el apartado 4.2.1 como controles positivos de los anticuerpos utilizados para identificar células inmunes.

Procedimiento general de IHQ indirecta

- 1) Incubación de los cortes 10 minutos en la estufa a 60°C.
- 2) Desparafinado en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.
- 3) Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de alcohol etílico absoluto (dos pasajes de 3 minutos), alcohol etílico 96° (un pasaje de 3 minutos) y finalmente alcohol etílico 70° (un pasaje de 3 minutos).
- 4) Lavado en PBS pH 7,2 durante 5 minutos.

- 5) Tratamiento de Recuperación antigénica (a).
- 6) Lavado en PBS (de 5 minutos cada uno).
- 7) Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa. Solución de H_2O_2 (b) en metanol durante 20 minutos (10+10).
- 8) Lavados en PBS (de 5 minutos cada uno).
- 9) Bloqueo de los sitios de unión no-específicos con Solución de Bloqueo (c) durante 15 minutos en cámara húmeda.
- 10) Ecurrido del exceso de solución y sin lavado previo, cubrimiento con el anticuerpo primario, de acuerdo al procedimiento correspondiente. Incubación en cámara húmeda durante toda la noche (O.N.) a la temperatura correspondiente, según el anticuerpo utilizado (tabla 3)
- 11) 2 lavados en PBS (de 5 minutos cada uno).
- 12) Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos en cámara húmeda.
- 13) 2 lavados en PBS (de 5 minutos cada uno).
- 14) Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa (lista para usar) o extravidina-peroxidasa (en dilución 1:200 en PBS estéril pH 7.2), según el anticuerpo utilizado, durante 30 minutos a T.A. en cámara húmeda.
- 15) 3 lavados en PBS (de 5 minutos cada uno).
- 16) Revelado de la reacción con DAB. Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo.
- 17) 2 lavados en agua destilada (de 5 minutos cada uno).
- 18) Coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur) diluida 1:2 en agua destilada, 5 a 30 segundos.
- 19) 3 lavados en agua destilada
- 20) Virado en agua corriente.
- 21) Deshidratación y montaje con Bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

Tabla 2: Condiciones de anticuerpos utilizados en IHQ						
AC. PRIMARIO	ORIGEN	R.A.	INCUBACIÓN	DILUCION IHQ	SISTEMA PEROXIDASA	AC. SECUNDARIO
TLR-2	TLR2 Polyclonal GenWay Biotech, Inc., San Diego USA	*	*	1:200	*	***
TLR-4	TLR-4 Polyclonal GenWay Biotech, Inc., San Diego USA	*	*	1:200	*	***
CD14	Clon RPA-M1, Zymed	**	**	1:30	*	*
TNF- α	Rabbit anti-ovine TNF- α (Chemicon, San Francisco, CA, USA)	*	*	1:100	*	**
IL-1- α	Anti human IL-1 α polyclonal (Endogen, Woburn, USA)	*	*	1:100	*	**
IL-6	Anti porcine IL-6 (Clon 77830; R&D Systems, Minneapolis, USA)	*	*	1:200	*	*
IL-17	Anti-IL17 ab79056, rabbit polyclonal, Abcam	*	*	1:150	*	*****
Lf	Lactoferrina Bovina (Chanetton)	*	*	1:1000	*	**
CD2	Anti-Bovine CD2 clon CC42 (Serotec)	*	*	1:50	*	*
CD79	Anti-CD79a mouse monoclonal [HM47/ A9] ab3121, Abcam	*	*	1:200	*	*
TGF- β 1	Polyclonal (sc-146, Santa Cruz Biotechnology)	***	**	1:25	*	**
TGF- β 2	Polyclonal (sc-90, Santa Cruz Biotechnology)	*	*	1:200	*	**
TGF- β 3	Polyclonal (sc-83, Santa Cruz Biotechnology)	*	*	1:200	*	**
TGF- β R1	Polyclonal (ab31013, Abcam)	***	*	1:25	*	**
TGF- β R3	Polyclonal (ab28366, Abcam)	***	*	1:50	*	**
Colageno I	Polyclonal (2150-0510, AbD Serotec)	*	*	1:350	*	**
PCNA	Anti Mouse PCNA clon PC-10, Santa cruz: SC-56	*	*	1:400	**	*****
Ki-67	Monoclonal (Clon 7B11, Invitrogen)	*	*	1:50	**	*****
Bax	Polyclonal (PU347-UP, Biogenex, San Ramon, CA, USA)	*	*	1:100	**	*****
Bcl-2	Polyclonal (ab 7973, Abcam, Cambridge, MA, USA)	*	*	1:100	**	*****
FAS	Monoclonal (Human activating, clone CH11, 05-201, Millipore)	*	*	1:300	**	*****
Caspasa-3	Polyclonal (AF835, R&D systems, USA)	*	*	1:75	**	*****

(R.A.) Recuperación antigénica		Sistema peroxidasa:	
* Microondas con buffer citrato	* Extravidina-peroxidasa (BioGenex, San Ramón, CA) - 1:200	* Streptavidina-peroxidasa (CytoScan HRP Detection System, Cell Marque, CA, USA)	
** Digestión enzimática con tripsina			
*** Ebullición en olla a presión			
Incubación:		Anticuerpo Secundario:	
* Toda la noche en heladera (4°C)	* IgG anti-mouse biotinilado, LEIH, Sta. Fe, Arg. - 1:100	** IgG anti-rabbit biotinilado, LEIH, Sta. Fe, Arg. - 1:100	
** Toda la noche a temperatura ambiente (25°C)	** Biotinylated anti-rabbit IgG Polyclonal (Zymed) - 1:100	**** Monoclonal Santa Cruz - 1:100	
	***** Policlonal Santa Cruz - 1:100	***** Universal (CytoScan HRP Detection System, Cell Marque, CA, USA)	

Tabla 3: Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en IHQ, características y condiciones de uso.

(a) Recuperación antigénica

En microondas:

Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 1200 W). Se colocaron los cortes en vaso de Coplin con tapa perforada, sumergidos en una solución de buffer Citrato 0,01M pH 6,0, en el cual se sumergieron los cortes y se calentaron durante 3 minutos a 100% de potencia y luego durante 12 minutos a 40% (6 minutos + 6 minutos), enfriándose luego 20 minutos dentro del microondas apagado.

Ebullición en olla a presión:

Se realizó en olla a presión en condiciones de ebullición. Como solución se usó Buffer EDTA 1mM, 0,05% Tween 20, pH8.0. Se precalentó el buffer en vaso de Coplin con tapa perforada durante 20 minutos en la olla tapada, luego se colocaron los cortes en el vaso de Coplin, cerrando la tapa correctamente pero con la espita abierta, por 20 minutos. Posteriormente se dejó enfriar por 20 minutos dentro de la olla.

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

Se preparó la enzima 10 minutos antes de ser utilizada, diluyendo 1 gota de la misma en 2 de diluyente, y se precalentó 10 minutos en estufa a 37°C. Luego de bloquear la peroxidasa endógena en el protocolo de IHQ, los preparados fueron lavados en agua destilada y se aplicó la enzima durante 10 minutos a 37°C. Seguido, se realizaron 3 lavados de 5 minutos c/u en PBS y se prosiguió con el protocolo de IHQ.

(b) Solución de H₂O₂:

Se preparó con 36 ml de metanol y 4 ml de H₂O₂ para 10 portaobjetos dorso con dorso en el vaso de Coplin. Se sumergieron por 10 minutos en esta solución, y a los 10 minutos se agregaron 4 ml adicionales de H₂O₂ hasta la finalización de los restantes 10 minutos.

(c) Solución de Bloqueo:

Se cubrieron los cortes con solución de bloqueo (suero normal de cabra al 10%), incubándose en cámara húmeda a T. A.

4.6.2- Caracterización de la respuesta inmune innata y adaptativa por IHQ: componentes evaluados

Receptores: se evaluó la expresión semicuantitativa y localización celular específica de dos receptores de la inmunidad innata: TLR2 y TLR4. Las especificaciones utilizadas para este anticuerpo se detallan en la Tabla 3.

Células: para caracterizar la respuesta inmune innata se realizó la identificación y cuantificación en tejido mamario de monocitos-macrófagos utilizando el anticuerpo monoclonal anti CD14. Para caracterizar la respuesta inmune adaptativa se realizó la identificación y cuantificación de linfocitos T, utilizando un anticuerpo monoclonal anti CD2, y linfocitos B utilizando un anticuerpo monoclonal anti CD79. Las especificaciones utilizadas para cada anticuerpo se detallan en la Tabla 3.

Factores solubles: Se analizó la localización celular específica y expresión semicuantitativa de Lf bovina utilizando un anticuerpo policlonal anti Lf bovina desarrollado por Chanetton y col. (2008). La Lf, purificada y biotinilada con NHS-LC-Biotin (Pierce Chemicals Co, Rockford, IL, EEUU), junto al anticuerpo específico contra esta proteína fueron generados y cedidos gentilmente por el Dr. Luciano Chanetton y por el Dr. Busman. Las especificaciones de uso se detallan en la Tabla 3.

Citoquinas: Se evaluó la localización celular específica y la expresión semicuantitativa en tejido mamario de TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-17 utilizando anticuerpos específicos. Las especificaciones utilizadas para cada anticuerpo se detallan en la Tabla 3.

4.6.3- ELISA sandwich para evaluar citoquinas

Las muestras destinadas a los ensayos de ELISA fueron descongeladas y desengrasadas siguiendo un protocolo de rutina. Brevemente, se centrifugaron a 1500 g durante 20 minutos a 4°C. Luego, se extrajo con espátula la grasa adherida a las paredes de la parte superior del tubo. Posteriormente, se realizó una segunda centrifugación a 14700 rpm durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se extrajo la porción acuosa superior con jeringa de 1 ml y aguja, alicuotándose en tubos eppendorf de 0,5 ml a -80°C.

Los niveles de IL-1 β , IL-4 e IL-6 en secreción mamaria se determinaron mediante el uso de kits comerciales (Bovine IL-1 β ELISA Reagent kit, Thermo Scientific Inc., Waltham, USA; Bovine IL-4 ELISA Reagent kit, Thermo Scientific Inc., Waltham, USA; Bovine IL-6 ELISA Reagent kit, Thermo Scientific Inc., Waltham, USA) siguiendo la metodología detallada en las correspondientes hojas técnicas.

El fundamento de la técnica consiste en la captura de antígenos y detección mediante inmunocomplejos. Se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado, que elimina el material no retenido, se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y a un segundo anticuerpo que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

Brevemente, la microplaca se sensibilizó con el anticuerpo de recubrimiento y se incubó durante toda la noche. Se bloqueó con una solución de 4% de BSA y 5% de sacarosa en D-PBS. Muestras y estándares se colocaron por duplicado en los pocillos de la placa y se incubaron a T.A. durante 1 h. Las muestras se lavaron y se añadió el anticuerpo de detección (anticuerpo conjugado con biotina) y se incubaron durante 1 h. Después de los lavados, se añadió estreptavidina conjugada a peroxidasa y se incubó durante 30 min. La reacción se evidenció por la adición de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina como solución de cromógeno (sustrato TMB), que se incubó durante 20 min., y la reacción se detuvo con H₂SO₄ (Stop solution). Las lecturas se

realizaron a 450 nm con un lector de ELISA (Lector de Microplacas, SPECTROstarNano, BGM / LABTECH, Ortemberg, Alemania).

4.7- Caracterización de la remodelación y de los cambios histomorfométricos

Se evaluó mediante la técnica de IHQ la localización celular específica y la expresión semicuantitativa de proteínas relacionadas con la remodelación de la glándula mamaria: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 y los receptores TGF- β R1 y TGF- β R3. Asimismo, se evaluó la expresión proteica de colágeno I. Las especificaciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se detallan en la Tabla 3.

La evaluación de los cambios histomorfométricos en tejido mamario infectado con *S. aureus* y en tejido mamario no infectado se realizó mediante análisis digital de imágenes sobre secciones coloreadas con hematoxilina y eosina. La metodología se describe en el punto 4.11.

4.8- Caracterización de la proliferación celular y apoptosis por IHQ

Se evaluó mediante IHQ, la expresión nuclear de PCNA y Ki-67 como antígenos marcadores de proliferación celular utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Por otra parte, se evaluó la localización celular específica y expresión semicuantitativa de diferentes proteínas reguladoras de la apoptosis: Bcl-2 (proteína antiapoptótica), Bax (proteína proapoptótica), receptor Fas (inductor de apoptosis) y caspasa-3 activa (proteasa efectora). Las especificaciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se detallan en la Tabla 3.

4.9- Detección de apoptosis *in situ* mediante la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling*)

Para la detección *in situ* de células apoptóticas se empleó la técnica TUNEL utilizando un kit comercial (ApopTag Plus peroxidasa, Chemicon Internacional, Temecula CA, EE.UU.). 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.

Brevemente, la técnica incluyó los siguientes pasos: después de la desparafinación e hidratación, se realizó la recuperación antigénica. Para esto los cortes se incubaron con proteinasa K (Dako North America Inc., Carpinteria CA, EE.UU.) durante 15 minutos a 25°C. La enzima se preparó 10 minutos antes de ser utilizada (40 µl de enzima en 2 ml de buffer 0.05 M de pH 7.5) y se precalentó en estufa a 25°C durante 10 minutos. Luego de la incubación con la enzima, se realizó un lavado en solución buffer y se inactivó la peroxidasa endógena en una solución de metanol y H₂O₂ al 3%. Seguidamente al lavado en PBS, los cortes se incubaron en una solución buffer de equilibrio durante 10 min. Posteriormente, se incubaron con la enzima TdT durante 60 min a 37 ° C. Las secciones se lavaron luego con solución buffer de stop durante 10 min y después se incubaron con anti-digoxigenina-peroxidasa durante 30 min a 25 ° C. Las secciones de tejido se lavaron en PBS y luego fueron incubadas con DAB durante aproximadamente 6 min a T. A. hasta visualizar la inmunomarcación. Finalmente, los cortes se lavaron en agua destilada, se contracoloraron con hematoxilina de Mayer, y fueron deshidratados y montados.

4.10- Análisis digital de imágenes

La evaluación de las técnicas de IHQ y TUNEL se realizó por análisis digital de imágenes, utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetic), siguiendo métodos ya descritos en trabajos previos (Dallard y col., 2007, 2008, 2009, 2013; Baravalle y col., 2015). Las imágenes microscópicas fueron generadas con un microscopio Olympus BH-2 (Olympus Co., Tokyo, Japon) y digitalizadas mediante una cámara Olympus C5060 (Olympus Co., Tokyo, Japon) conectada a una PC. Las imágenes fueron tomadas en una magnificación de 40X y almacenadas bajo el formato TIFF con una definición de 1200 x 1600 pixels y 24 bits de color. A la magnificación usada, cada píxel de la imagen correspondía a 0,13 µm y cada campo representaba un área de tejido de 0,032 mm².

4.10.1- Cuantificación del área inmunomarcada

Mediante análisis digital de imágenes se cuantificó la expresión proteica de los receptores de la inmunidad innata (TLR2, y TLR4), citoquinas (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-17), Lf, componentes de la familia de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β R1, TGF- β R3), colágeno I, proteínas regulatorias de la apoptosis (Bcl-2, Bax, receptor Fas y caspasa-3 activa). El método de cuantificación de niveles de expresión aquí utilizado se detalla en trabajos previos (Dallard y col., 2013; Baravalle y col., 2015). Brevemente, el área inmunomarcada por la reacción de los anticuerpos, fue calculada como porcentaje del área total evaluada a través de análisis de segmentación de colores, localizando todos los objetos de color específico dado por el cromógeno utilizado (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 40 imágenes en cada una de las siguientes estructuras: alvéolos, conductos y tejido intersticial. La inmunomarcación de todas las proteínas mencionadas anteriormente se cuantificó utilizando la metodología descripta.

4.10.2- Cuantificación del número de células inmunes por unidad de área

Los CD ó (“cluster de diferenciación”) que significa “grupo de diferenciación”, son proteínas estructurales de membrana clasificadas en series de superfamilias. Cada superfamilia se caracteriza porque las proteínas que la integran reúnen características estructurales comunes. Normalmente, comparten dominios de proteína de un determinado tipo.

El CD14 es un marcador principalmente de monocitos-macrófagos y en segunda medida de neutrófilos Es un co-receptor para LPS bacteriano, prácticamente ausente en los granulocitos (Fainboim y Geffner, 2008). Los macrófagos fueron identificados como células grandes redondeadas con un diámetro entre 15-20 μ m, con citoplasma abundante y con mayor cantidad de vacuolas y gránulos que el monocito.

En bovinos, CD2 ha sido identificado en linfocitos T CD4+ y CD8+ y en una pequeña población de linfocitos T CD4-/CD8- (Davis y Splitter, 1991).

El CD79 es una proteína transmembranal que forma un complejo con el receptor de linfocito B (BCR) y genera una señal después de que el BCR reconoce al antígeno, cuyo patrón de marcación es la membrana citoplasmática de linfocitos B y plasmocitos. Los linfocitos, en general sin discriminar en tipos, son células pequeñas, de un diámetro de unos 7 μm , con un núcleo redondeado que ocupa casi toda la célula.

Para analizar la expresión de CD14, CD2 y CD79 en el tejido mamario, se digitalizaron imágenes de todo el preparado sometido a IHQ en un aumento de 40X y se calculó la cantidad de células positivas por unidad de área (mm^2) según la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células positivas/mm}^2 = \frac{\text{Número de células positivas/campo microscópico}}{\text{Área total del campo microscópico } (\mu\text{m})} \times 1000000$$

4.10.3- Cuantificación del porcentaje de células en proliferación (antígenos nucleares)

La proliferación celular se evaluó a través de la inmunomarcación de PCNA y Ki67. 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, mediante el análisis de imágenes almacenadas se establecieron 3 rangos de intensidad: débil (1+), moderado (2+) e intenso (3+). Se contaron en cada preparado, como mínimo 1500 células, tanto en parénquima como en estroma, en 40X, 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 Ki-67 todas las células que presentaron reacción nuclear homogénea e intensa se consideraron positivas. Se contaron en cada preparado como mínimo 1500 células del parénquima y del estroma de la glándula mamaria en un mínimo de 20 campos y a una magnificación de 40X.

4.10.4- Cuantificación de la apoptosis in situ

La cuantificación de células apoptóticas detectadas mediante la técnica TUNEL se realizó siguiendo la metodología antes descrita para la evaluación de la proliferación celular.

4.10.5- Balance proliferación/apoptosis

El balance entre células en proliferación y células apoptóticas fue estimado usando la razón entre los porcentajes de células Ki-67 inmunomarcadas y los porcentajes de células TUNEL positivas tanto en células del parénquima como del estroma mamario.

4.11- Estudios morfométricos

Para los estudios morfométricos se realizó un análisis cuantitativo para determinar el porcentaje de área de tejido mamario compuesta de parénquima y de estroma intralobulillar e interlobulillar. Se tomaron 20 imágenes por corte a 20 X de magnificación, evitando las zonas de los bordes. Al aumento utilizado, cada campo de la pantalla representó un área de tejido de 0,28 mm². Los porcentajes de estroma intra e interlobulillar y de parénquima fueron obtenidos usando una herramienta de medición manual del programa Image Pro-Plus 3.0.1. Primero se calculó el área compuesta por parénquima, y luego la compuesta por estroma intralobulillar. El área correspondiente a estroma interlobulillar se calculó como la diferencia entre el área total de tejido y la suma del área compuesta por estroma intralobulillar y parénquima.

4.12- Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados

La homología entre la proteína bovina a identificar y el péptido diana contra el cual fue dirigido cada anticuerpo primario utilizado en IHQ fue testada usando Basic Local Alignment Search Tool (software BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.12.1- Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La especificidad de los anticuerpos utilizados en IHQ también fue evaluada por WB. Para esto, las proteínas provenientes de tejido fueron separadas por electroforesis desnaturalizante (PAGE-SDS) en condiciones reductoras en geles discontinuos de poliacrilamida (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida-bisacrilamida a diferentes porcentajes, dependiendo del peso de la proteína a resolver (8% para colágeno I, 15 % para el resto de las proteínas). Las muestras fueron diluidas en buffer de muestra para SDS-PAGE e incubadas en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron separadas electroforéticamente junto a los marcadores de peso molecular (PM, Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324, BIO-RAD). Dichas proteínas se detallan en la Tabla 4. Se utilizó una cuba vertical de Bio-Rad (California, USA) sembrando los volúmenes adecuados para 40 o 60 µg de proteína para las muestras de tejido (según el gel elaborado) y realizando una corrida electroforética durante 50 minutos a 25 mA para el gel de apilamiento y luego durante 80 minutos a 50 mA para el gel de resolución. Se utilizó el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS pH 8,3. Luego de finalizada la corrida se procedió a la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham-GE Healthcare-Argentina), para lo cual se utilizó el buffer de transferencia Towbin modificado compuesto por Tris-Glicina con 20 % de metanol. Se realizó la transferencia en frío a 100 V durante 150 minutos. Al término de este periodo se coloreó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para corroborar la efectividad de la transferencia. Luego se lavaron las membranas con agua destilada seguido de buffer Tris salino-Tween (TBS-T) hasta la desaparición del colorante. Con el mismo propósito se coloreó el gel con Coomassie Brilliant Blue 250G.

4.12.2- Western blot

Las membranas obtenidas de las muestras de tejido fueron hidratadas en TBS-Tween y bloqueadas con TBS-Tween-Leche 5%, durante 5 hs a T.A. en agitación. Luego de 5 lavados en TBS-Tween, se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución de los anticuerpos detallados en la Tabla 4, preparada en TBS-T-BSA 2,5 %, en

cámara húmeda. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TBS-Tween y luego se incubó la membrana con una dilución del anticuerpo secundario en TBS-T-BSA 2,5 % por 1 h 30 minutos a 25 °C en agitación. Luego de realizar 5 lavados con TBS-Tween se detectó la señal específica por quimioluminiscencia, (Sistema ECL Plus, GE Healthcare). Las membranas fueron expuestas a una placa radiográfica (ECL, GE Healthcare) durante el tiempo necesario. El revelado de la placa se realizó en forma manual utilizando soluciones de revelador y fijador (Kodak, Rochester, N.Y., USA). Las placas radiográficas fueron escaneadas a 600 dpi (scanner HP Officejet J5780) y las imágenes obtenidas fueron almacenadas con formato TIFF. En la Tabla 4 se pueden observar los anticuerpos utilizados y las respectivas condiciones de cada uno.

Tabla 3: Condiciones de anticuerpos utilizados en WB			
AC. PRIMARIO	ORIGEN	DILUCIÓN WB	AC. SECUNDARIO
TLR-2	TLR2 Polyclonal GenWay Biotech, Inc., San Diego USA	1:400	**
TLR-4	TLR-4 Polyclonal GenWay Biotech, Inc., San Diego USA	1:400	**
TNF- α	Rabbit anti-ovine TNF- α , (Chemicon, San Francisco, CA, USA)	1:150	**
IL-1- α	Anti human IL-1 α polyclonal (Endogen, Woburn, USA)	1:100	**
IL-6	Anti porcine IL-6 (Clon 77830; R&D Systems, Minneapolis, USA)	1:200	*
IL-17	Anti-IL17 ab79056, rabbit polyclonal, Abcam	1:100	
TGF- β 1	Polyclonal (sc-146, Santa Cruz Biotechnology)	1:15	***
TGF- β 2	Polyclonal (sc-90, Santa Cruz Biotechnology)	1:75	***
TGF- β 3	Polyclonal (sc-83, Santa Cruz Biotechnology)	1:100	***
TGF- β R1	Polyclonal (ab31013, Abcam)	1:15	***
TGF- β R3	Polyclonal (ab28366, Abcam)	1:25	***
Colageno I	Polyclonal (2150-0510, AbD Serotec)	1:200	***
Bcl-2	Polyclonal (ab 7973, Abcam, Cambridge, MA, USA)	1:250	****
Bax	Polyclonal (PU347-UP, Biogenex, San Ramon, CA, USA)	1:100	**** (*)
FAS	Monoclonal (Human activating, clone CH11, 05-201, Millipore)	1:500	****
Caspasa-3	Polyclonal (AF835, R&D systems, USA)	1:100	**** (*)
Anticuerpo Secundario:			
* Anti-mouse IgG peroxidase Polyclonal (Amersham, Buckinghamshire, UK) - 1:500			
** Anti-rabbit IgG peroxidase Polyclonal (Amersham, Buckinghamshire, UK) - 1:500			
*** IgG anti-rabbit biotinilado, LETH - 1:1000			
**** Goat anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA - 1:600			
***** Goat anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA - 1:7500 - (*) 1:15000			

Tabla 4: Condiciones de uso de anticuerpos utilizados en WB.

4.13- Caracterización de la capacidad fagocítica de macrófagos *in vitro*

Los ensayos para evaluar la capacidad fagocítica de macrófagos purificados a partir de secreciones mamarias provenientes de cuartos sanos e infectados con *S. aureus* se realizaron sobre muestras del día 7, 14 y 21 post secado.

Los macrófagos fueron purificados siguiendo la metodología previamente descrita por Almeida y Oliver (1993). Brevemente, las muestras de secreción mamaria de cada tiempo se diluyeron al medio con PBS estéril y se centrifugaron a $400 \times g$ durante 10 min a 40 C. El pellet obtenido se lavó una vez más y se resuspendió en 40 ml de PBS estéril. Se agregó en el fondo del tubo 5 ml de Histopaque 1083, y se centrifugó 20 min a $400 \times g$ a T.A. Las células mononucleares se obtuvieron de la interfase entre la solución de Histopaque y la suspensión que contenía a las células. Luego de lavarlas dos veces con PBS estéril, las células fueron contadas en cámara hemocitométrica de Neubauer y fueron almacenadas en Suero Bovino Fetal (SBF) conteniendo un 10% de Dimetil Sulfóxido (DMSO) en tanques de nitrógeno líquido para su conservación hasta el momento de su utilización.

Los ensayos de fagocitosis fueron realizados mediante citometría de flujo utilizando la cepa Reynolds de *S. aureus* marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y siguiendo la metodología empleada por Renna y col. (2014) con modificaciones. Brevemente, 100 μ l de una suspensión de la cepa Reynolds de *S. aureus* marcada con FITC (1×10^8 UFC/ml) fueron incubados con 100 μ l de una suspensión de 1×10^7 macrófagos/ml provenientes de secreciones mamarias de cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados durante 30 min a 37°C en agitación constante. La fagocitosis fue frenada por la adición de ClNa 0,85%/EDTA 0,04%. Finalmente, las células fueron teñidas con bromuro de etidio para apagar la fluorescencia extracelular (Weingart y col., 1999) y fueron adquiridas utilizando el citómetro Attune, NxT (Acoustic Focusing Cytometer A24860, Life Technology). Se seleccionó la región R1 que contiene a la población de células mononucleares teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (Side Scatter) y complejidad citoplasmática (Forward Scatter). El análisis de datos se realizó utilizando el programa FlowJo. Se calculó el porcentaje de macrófagos con bacterias internalizadas y se utilizó el parámetro de Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) como una estimación del número de bacterias internalizadas por célula positiva (Zetterlund y col., 1998).

4.14- Análisis estadístico

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Los datos obtenidos a partir de las áreas inmunomarcadas para los diferentes anticuerpos primarios utilizados, los números de células inmunes por unidad de área, los porcentajes de células proliferantes y en apoptosis fueron analizados estadísticamente utilizando un ANOVA factorial). A través de este modelo se testearon los efectos principales del *estado infeccioso* (cuartos sanos y cuartos infectados crónicamente por *S. aureus*), del *tiempo de muestreo* (días 7, 14 y 21 de involución) y de la *interacción entre ambos factores* (tiempo*estado infeccioso). Cuando la interacción fue significativa se realizaron pruebas-*t* para comparar medias individuales. Los datos se presentaron como medias entre tres muestras de tejido obtenidas del mismo cuarto mamario \pm desvío estándar (DE).

Para la evaluación estadística de los niveles de citoquinas en secreción mamaria de cuartos mamarios infectados y no infectados durante la involución se utilizó un ANOVA de medidas repetidas. Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Se consideraron significativas las diferencias de $p < 0.05$.

5- Resultados

Objetivo específico Nro. 1: Caracterizar la respuesta inmune innata y adaptativa en tejido mamario sano y con infecciones naturales crónicas por S. aureus durante la involución activa.

5.1- Caracterización de la respuesta inmune innata

5.1.1- Receptores tipo toll (TLR-2 y TLR-4)

A fines de obtener información acerca de la expresión y localización de los TLRs en el tejido mamario, se detectó la marcación citoplasmática obtenida a través de la técnica de IHQ.

La inmunomarcación correspondiente a TLR-2 se presentó en todas las secciones de tejido, tanto en los cuartos infectados crónicos con *S. aureus* como en sanos, asociada al dominio apical de células epiteliales alveolares y conductos excretores del parénquima mamario (Figura 5). En el estroma interalveolar y en el interior de conductos y alvéolos se observaron macrófagos y neutrófilos con su citoplasma inmunoreactivo. Los componentes de la matriz extracelular no reaccionaron a la inmunomarcación con el anticuerpo utilizado, mientras que las células endoteliales de los vasos sanguíneos mostraron reacción positiva.

En la figura 6 se grafican los porcentajes de inmunomarcación para TLR-2. La expresión de este receptor se vio influenciada tanto por los periodos de la involución evaluados ($p < 0,001$), como por el proceso infeccioso ($p < 0,001$), no existiendo interacción entre ambos factores ($p = 0,105$). La expresión de TLR-2 fue mayor en cuartos con infecciones crónicas que en cuartos sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). Tanto en cuartos infectados como en sanos, los mayores porcentajes de inmunomarcación se observaron al día 7 de la involución disminuyendo en forma gradual a lo largo del periodo de muestreo.

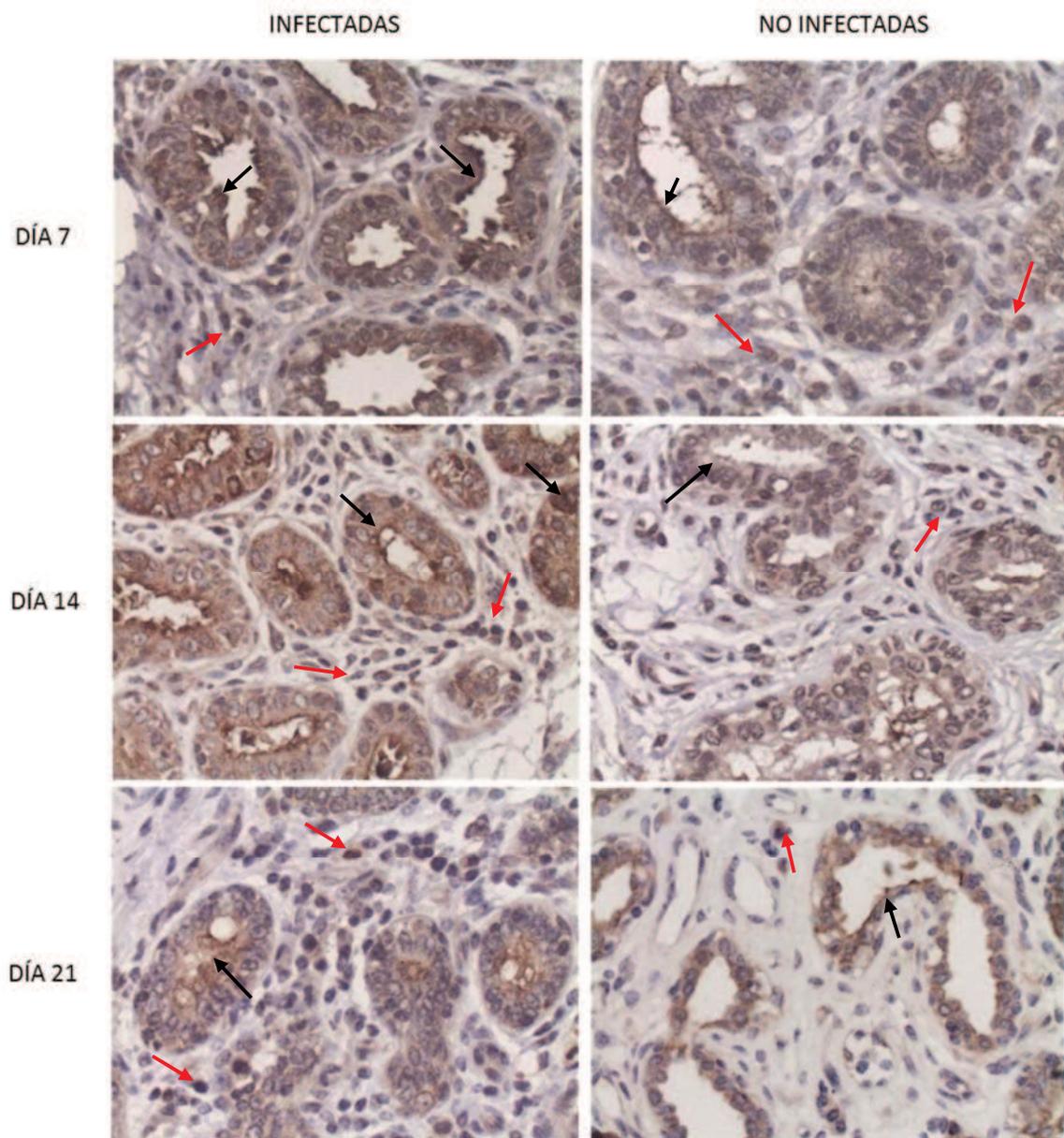


Figura 5: Inmunomarcación para TLR-2 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas en su dominio apical y conductos excretores del parénquima mamario. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en el estroma mamario. Aumento: 40X.

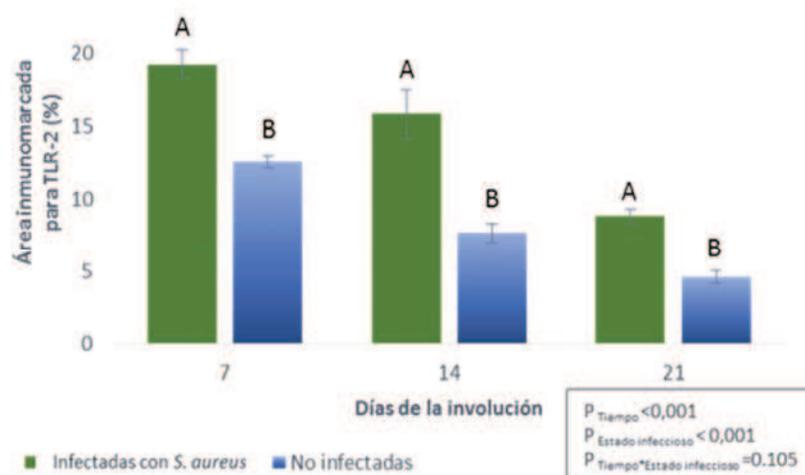


Figura 6: Porcentajes de área inmunomarcada para TLR-2 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

Como se observa en la figura 7, la inmunomarcación de TLR-4 se presentó en todas las secciones de tejido de ambos grupos, asociada tanto a componentes del estroma como del parénquima mamario. La marcación fue particularmente intensa a nivel del citoplasma de células epiteliales que revisten alvéolos y conductos, de neutrófilos, linfocitos y de células plasmáticas, así como en macrófagos presentes en el estroma y en la luz de los alvéolos.

En la figura 8 se grafican los porcentajes de inmunomarcación para TLR-4. La expresión de este receptor se vio influenciada por la infección ($p < 0,001$) y por los periodos de la involución evaluados ($p = 0,034$), no observándose interacción entre ambos factores ($p = 0,820$). La expresión de TLR-4 fue mayor en cuartos con infecciones crónicas que en cuartos sanos en todos los periodos ($p < 0,001$), observándose el mayor porcentaje de inmunomarcación al día 7 de la involución en cuartos infectados.

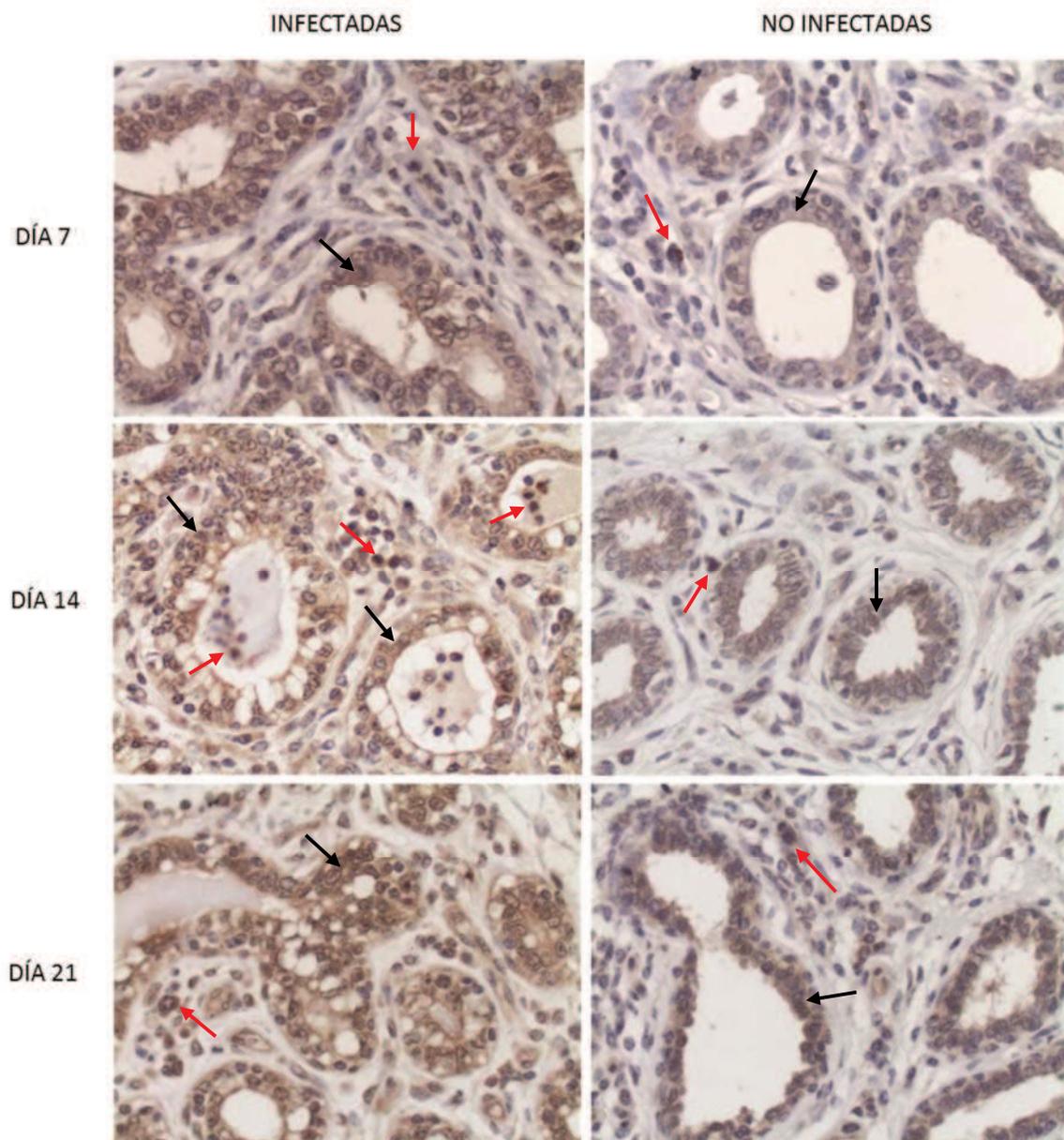


Figura 7: Inmunomarcación para TLR-4 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales intensamente marcadas que revisten alvéolos y conductos del parénquima mamario. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma dentro de los alvéolos. Aumento: 40X.

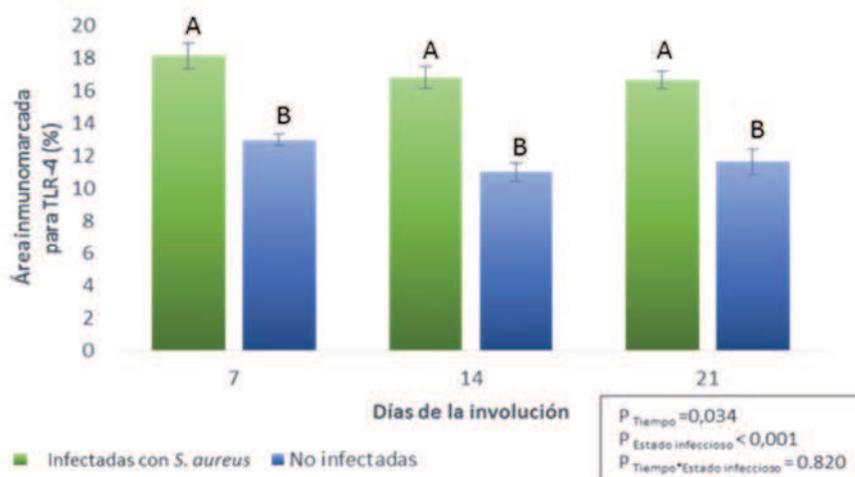


Figura 8: Porcentaje de área inmunomarcada para TLR-4 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

En la figura 9 se observa el resultado del western blot realizado a fines de evaluar la especificidad de los anticuerpos utilizados en IHQ. Se puede observar una banda a la altura de los 89,8 kDa y otra a los 95,7 kDa, correspondientes a los pesos moleculares de TLR-2 y TLR-4, respectivamente.

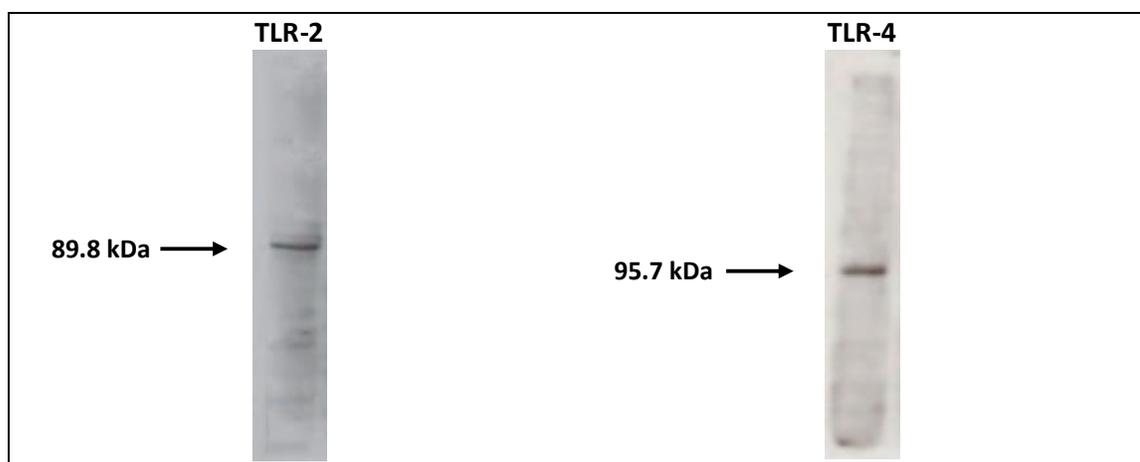


Figura 9: Western blot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ (anti- TLR-2 y anti- TLR-4) en tejido mamario.

5. 1.2- Monocitos-macrófagos: expresión de CD14

La marcación positiva para CD14 se observó a nivel de los monocitos-macrófagos presentes en estroma y lumen de conductos y alvéolos, y la misma estuvo asociada al citoplasma de estas células (Figura 10).

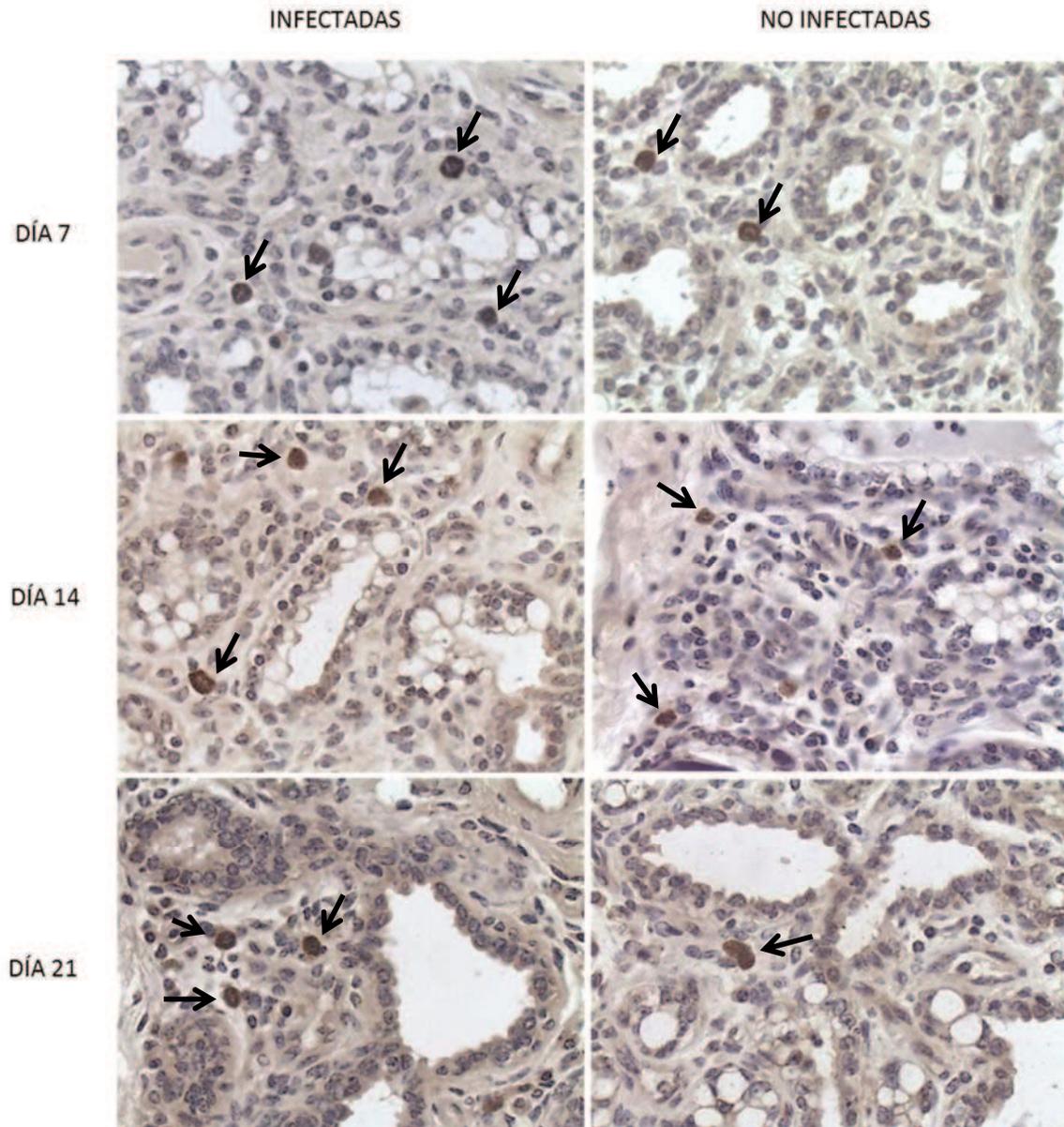


Figura 10: Monocitos-macrófagos inmunomarcados con anti CD14 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas indican células con reacción citoplasmática positiva. Aumento: 40X.

El número de monocitos-macrófagos/mm² (identificados con anti CD14) se vio influenciado por los periodos de la involución evaluados, tanto en los cuartos provenientes de animales infectados como en los libres de infección intramamaria ($p=0,001$). El número de células fue mayor en cuartos con infecciones crónicas que en cuartos sanos en todos los periodos de la involución evaluados ($p<0,001$). Se observó interacción entre los periodos de la involución evaluados y el estado de infección intramamaria ($p=0,038$). Al día 7 y 21 de la involución el número de células fue mayor en cuartos infectados en comparación con no infectados ($p=0,004$ y $p=0,007$, respectivamente); no así al día 14 donde no se observaron diferencias entre cuartos infectados y sanos ($p=0,054$) (Figura 11).

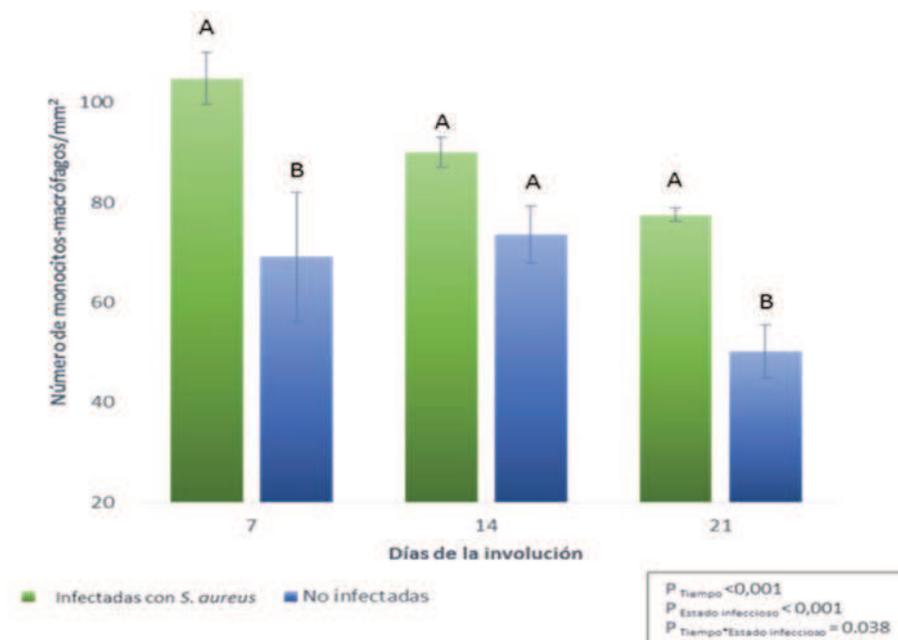


Figura 11: Número de monocitos-macrófagos por unidad de área (mm²) marcados con anti CD14 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias del número de monocitos-macrófagos/mm² en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p<0,05$).

5.1.3- Inmunodetección de citoquinas proinflamatorias

Para cada citoquina evaluada por IHQ se realizó la caracterización de su expresión *in situ* en tejido mamario infectado y sano. Se detectaron diferencias en los porcentajes de área inmunomarcada para cada grupo en estudio y para cada estadio de la involución.

TNF- α

Como se observa en la figura 12 la expresión de TNF- α , tanto en GM infectadas crónicamente con *S. aureus* como en sanas, se vio asociada a estructuras del parénquima y del estroma mamario en todos los periodos evaluados. Se observó marcación intensa en el citoplasma de las células epiteliales que revisten los alvéolos y conductos excretores. Además, células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos intraepiteliales reaccionaron intensamente con el anticuerpo utilizado, al igual que los endotelios y fibras musculares lisas de los vasos sanguíneos.

Como se observa en la figura 13, los porcentajes de inmunomarcación para TNF- α fueron mayores en cuartos infectados con respecto a los sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$), pero no se vio influenciada por los periodos de la involución ($p = 0,155$), ni se presentó interacción entre ambos factores ($p = 0,066$). En cuartos infectados, el área inmunomarcada para TNF- α fue mayor con respecto a los no infectados a los 7, 14 y 21 días ($p < 0,001$).

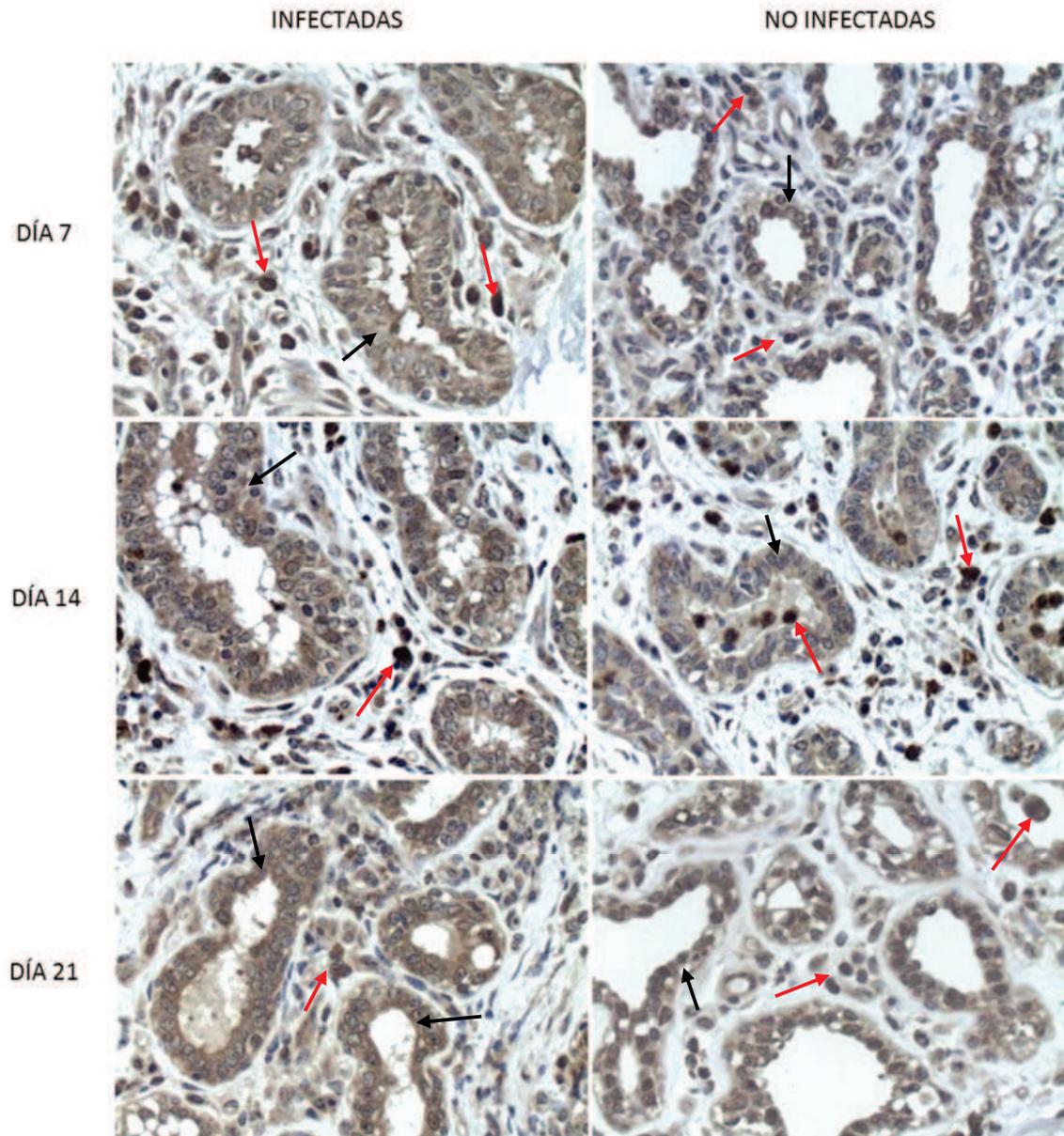


Figura. 12: Inmunomarcación para TNF- α en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma y dentro de los alvéolos mamarios. Aumento: 40X.

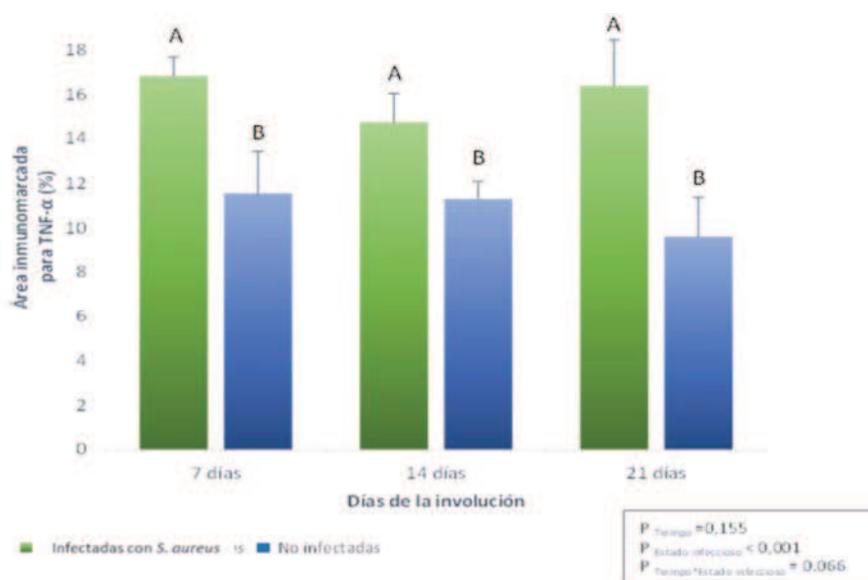


Figura 13: Porcentaje de área inmunomarcada para TNF- α en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

IL-1 α

La expresión de la IL-1 α se observó en los tejidos mamarios de los dos grupos evaluados y se asoció principalmente a estructuras del parénquima mamario, variando de débil a intensa. El citoplasma de las células epiteliales alveolares y de los conductos excretores reaccionó intensamente a la inmunomarcación. Por otra parte, diferentes células del estroma mamario como macrófagos, leucocitos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos también presentaron reacción positiva. El tejido conectivo del estroma intralobulillar e interlobulillar resultó negativo a la inmunomarcación (Figura 14).

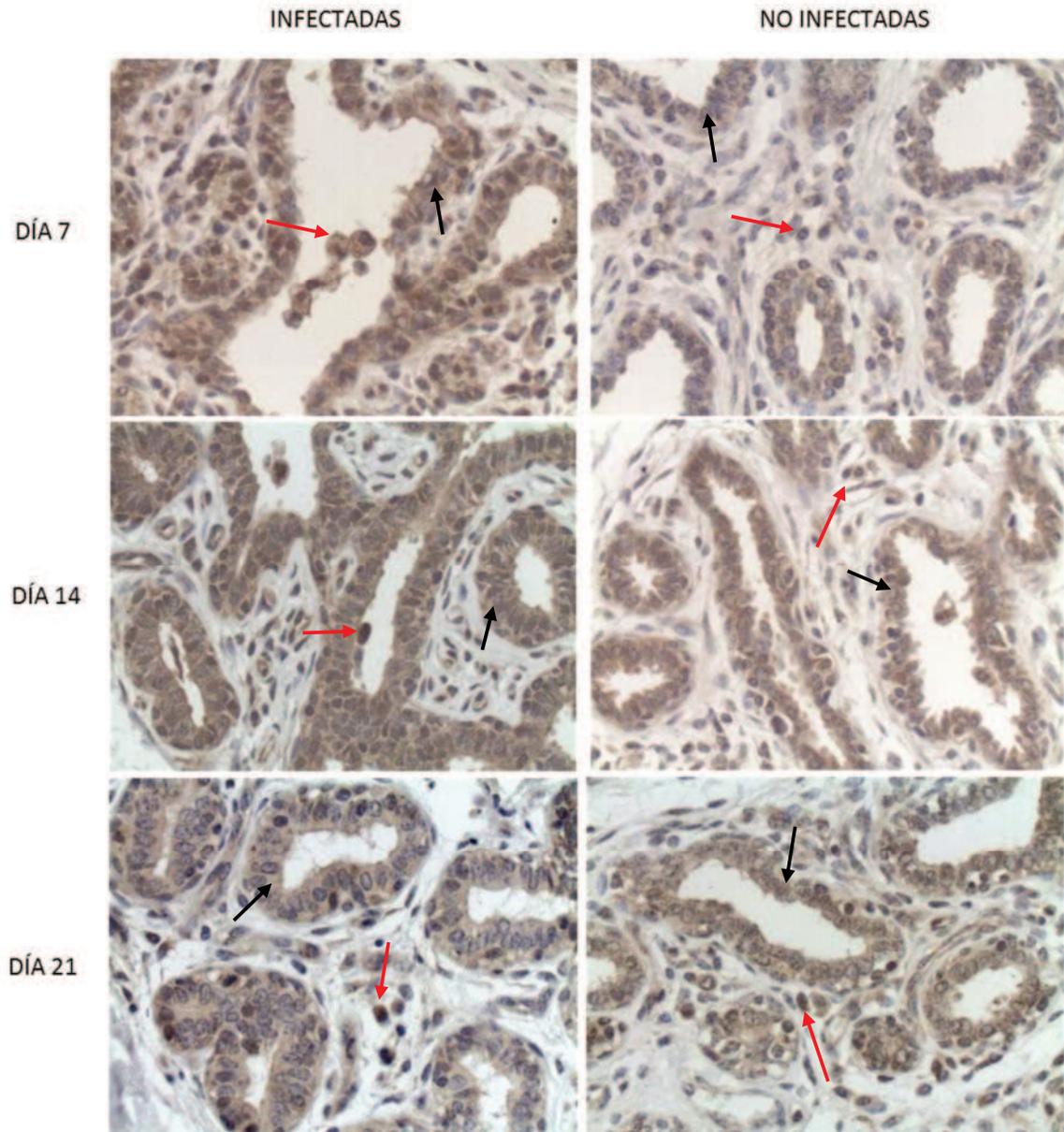


Figura 14: Inmunomarcación para IL-1 α en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares y de los conductos excretores intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del estroma, y células del sistema inmune ubicadas en estroma y dentro de los alvéolos mamarios. Aumento: 40X.

En la figura 15, se representan las medias de los porcentajes de inmunomarcación para IL-1 α . La expresión de esta citoquina no se vio influenciada por el tiempo de la involución ($p=0,183$), pero si por el proceso infeccioso ($p<0,001$) observándose una interacción entre ambos factores ($p<0,001$). Se observó que los porcentajes de marcación para esta citoquina fueron mayor en cuartos infectados con

respecto a los cuartos sanos al día 7 ($p < 0,001$) y 14 ($p = 0,001$) de la involución, mientras que al día 21 no se observaron diferencias entre cuartos infectados y sanos ($p = 0,556$).

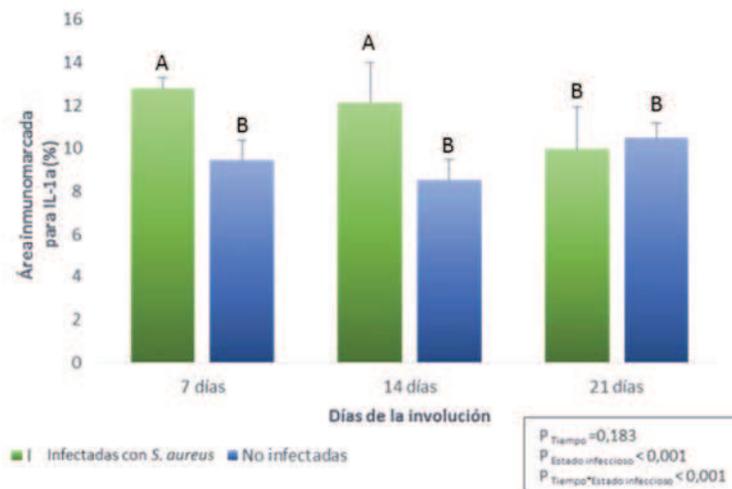


Figura 15: Porcentaje de área inmunomarcada para IL-1 α en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE).. Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

IL-6

La inmunomarcación para IL-6 se muestra en la figura 16. Al igual que para las demás citoquinas evaluadas, su expresión se detectó en todos los cuartos mamarios provenientes de GM con infección crónica y GM sin infección. El citoplasma de las células epiteliales de los alvéolos mamarios y de los conductos de excreción se vio intensamente teñido con el cromógeno utilizado. Además, los macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos presentaron tinción positiva.

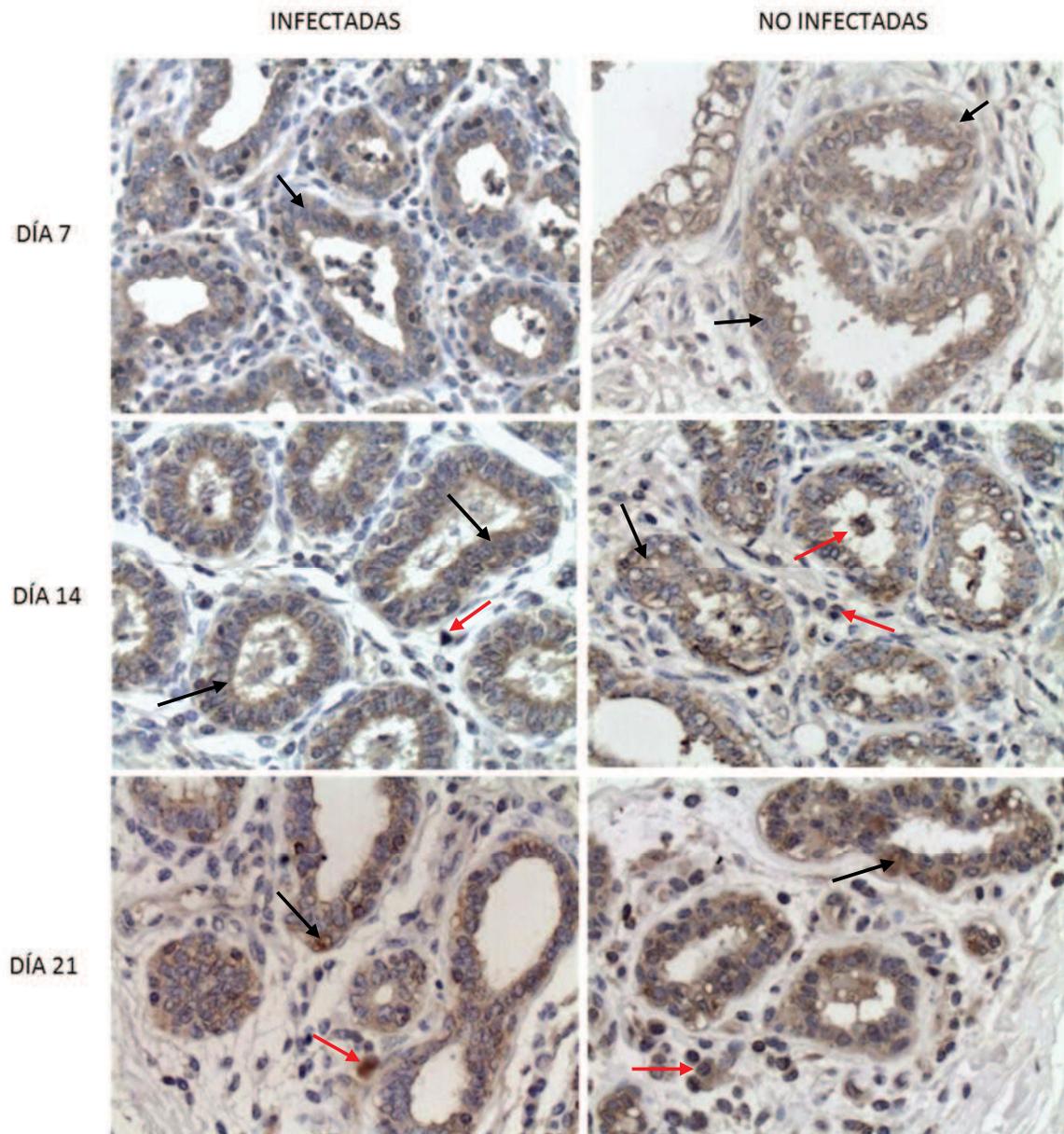


Figura 16: Inmunomarcación para IL-6 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares y de los conductos excretores intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del estroma y células del sistema inmune ubicadas en estroma y dentro de los alvéolos mamarios. Aumento: 40X.

Los porcentajes promedios de área inmunopositiva se grafican en la figura 17. Aquí se observa que la marcación de IL-6 no se vio influenciada ni por el tiempo de la involución ($p=0,110$), ni por el proceso infeccioso ($p=0,839$). Tampoco se observó interacción entre ambos factores evaluados ($p=0,140$). En cuartos infectados, no se observaron diferencias con respecto a los cuartos sanos en ninguno de los periodos de la involución evaluados (7 días, $p=0,085$; 14 días, $p=0,599$; 21 días, $p=0,084$).

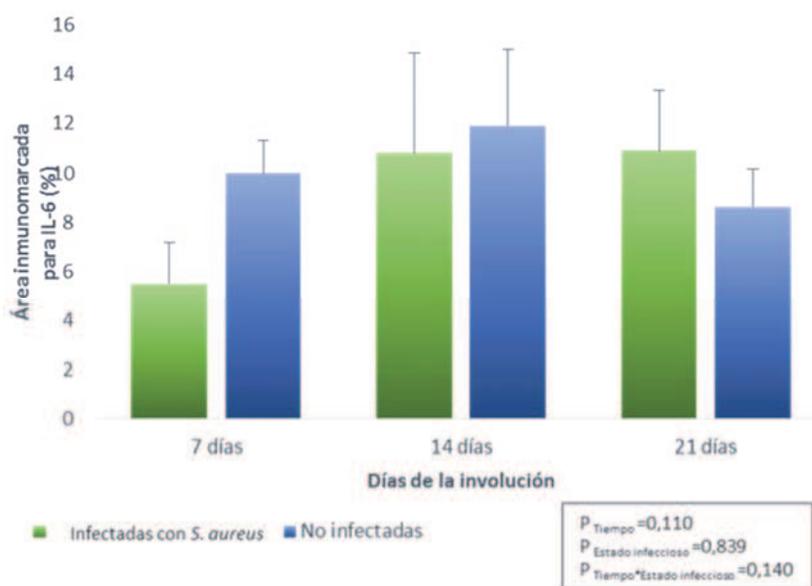


Figura 17: Porcentaje de área inmunomarcada para IL-6 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE).

IL-17

La expresión de IL-17, que se observa en la figura 18, fue positiva a nivel del parénquima, en el citoplasma de células epiteliales de los alvéolos mamarios y de los conductos de excreción. En el tejido conjuntivo interalveolar e intelobulillar se observaron células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos y neutrófilos reactivos a la inmunomarcación.

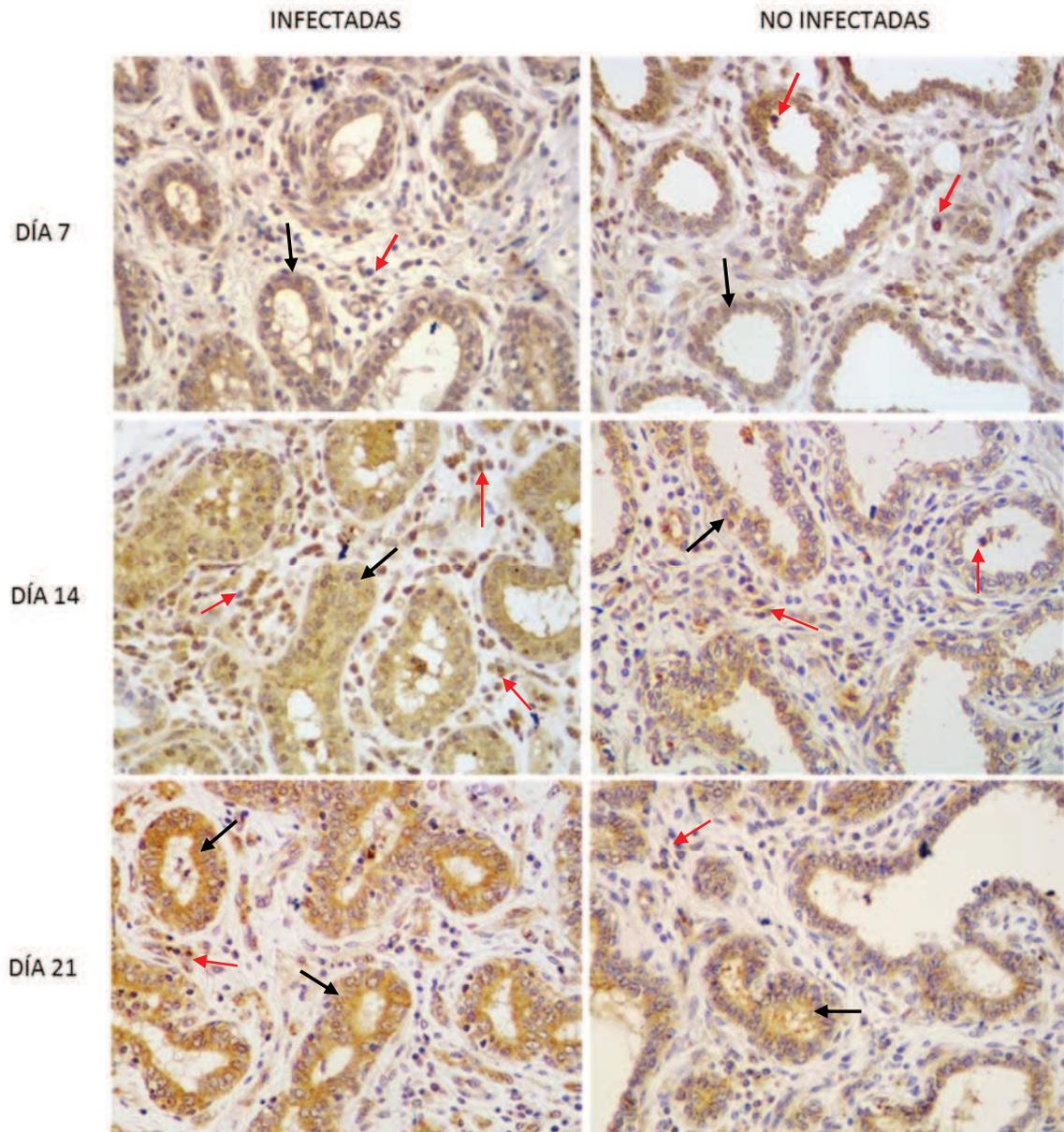


Figura 18: Inmunomarcación para IL-17 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma y dentro de los alvéolos mamarios. Aumento: 40X.

Los porcentajes promedio de área inmunopositiva para la IL-17 se grafican en la figura 19. Aquí se observa que la marcación de IL-17 se vio influenciada por el tiempo de la involución ($p=0,02$), por el proceso infeccioso ($p< 0,001$), al mismo tiempo que se observó interacción entre ambos factores evaluados ($p=0, 001$). Se observó que los porcentajes de marcación para esta citoquina fueron mayores en

cuartos infectados con respecto a los cuartos sanos al día 14 ($p=0,01$) y 21 ($p<0,001$) de la involución, mientras que al día 7 no se observaron diferencias entre cuartos infectados y sanos ($p=0,96$).

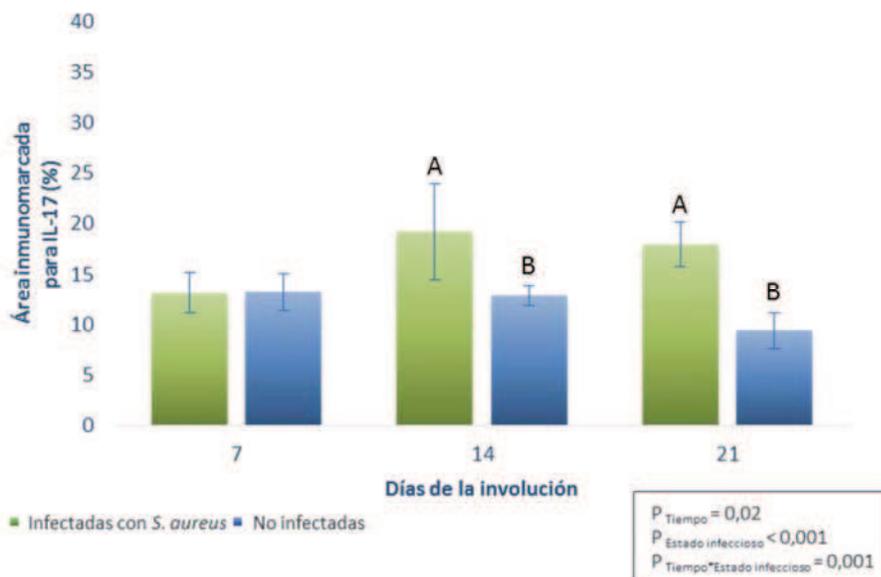


Figura 19: Porcentajes de área inmunomarcada para IL-17 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p<0,05$).

En la figura 20 se observan los resultados de los western blot realizados a fines de evaluar la especificidad de los anticuerpos utilizados en IHQ. En la figura A correspondiente a TNF- α se pueden observar dos bandas, una a la altura de los 26 kDa (forma madura de la glicoproteína) y otra a los 17 kDa (TNF- α soluble). En B se observa una banda a la altura de los 17 kDa correspondiente a IL-1 α . En C se observa una banda a los 26 kDa correspondientes al peso molecular de IL-6. Finalmente en D se observa una banda a los 18 kDa correspondiente a la IL-17.

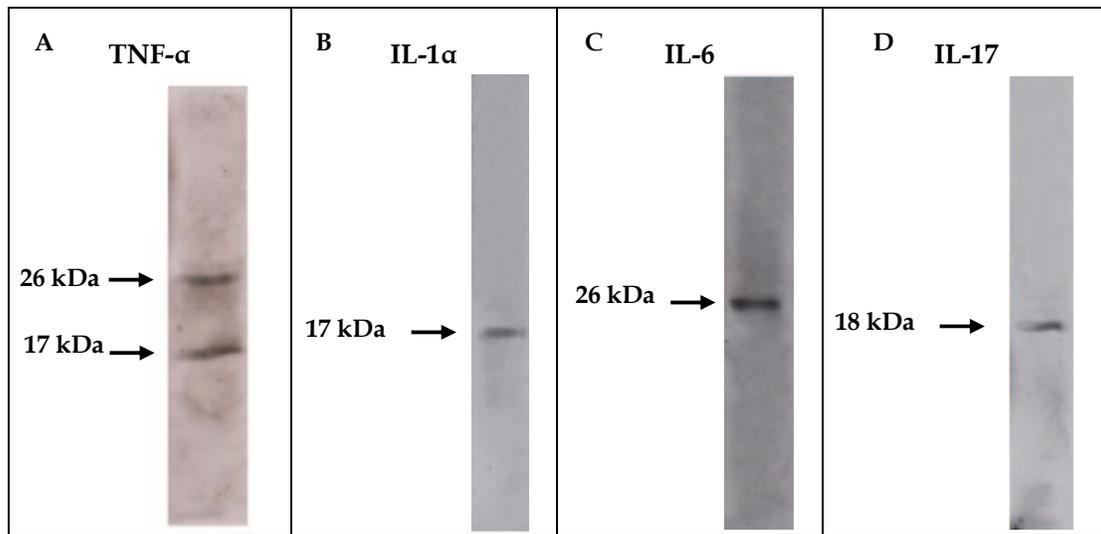


Figura 20: Western blot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ: anti- TNF- α (A), IL-1 α (B), IL-6 (C) e IL-17 (D) en tejido mamario.

5.1.4- Lactoferrina (Lf):

En cuartos mamarios infectados crónicamente con *S. aureus* y en libres de infección, la inmunomarcación para Lf se vio asociada a células epiteliales de la GM bovina y células del sistema inmune, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos (Figura 21).

En la figura 22 se grafican los porcentajes promedios de área inmunopositiva para Lf. La expresión proteica de LF se vio influenciada por los periodos de la involución evaluados ($p < 0.001$) y por el proceso infeccioso ($p = 0.003$), observándose además interacción entre ambos factores ($p < 0.001$). En ambos grupos evaluados (infectados y libres de infección) los porcentajes de inmunomarcación para la LF aumentaron desde el día 7 hasta día 14 de la involución observándose porcentajes de marcación similares ($p = 0.735$ y $p = 0.346$, respectivamente). A los 21 días de la involución, se observó una disminución significativa en la expresión de LF en los cuartos mamarios con infecciones crónicas en comparación con los cuartos no infectados ($p < 0.001$).

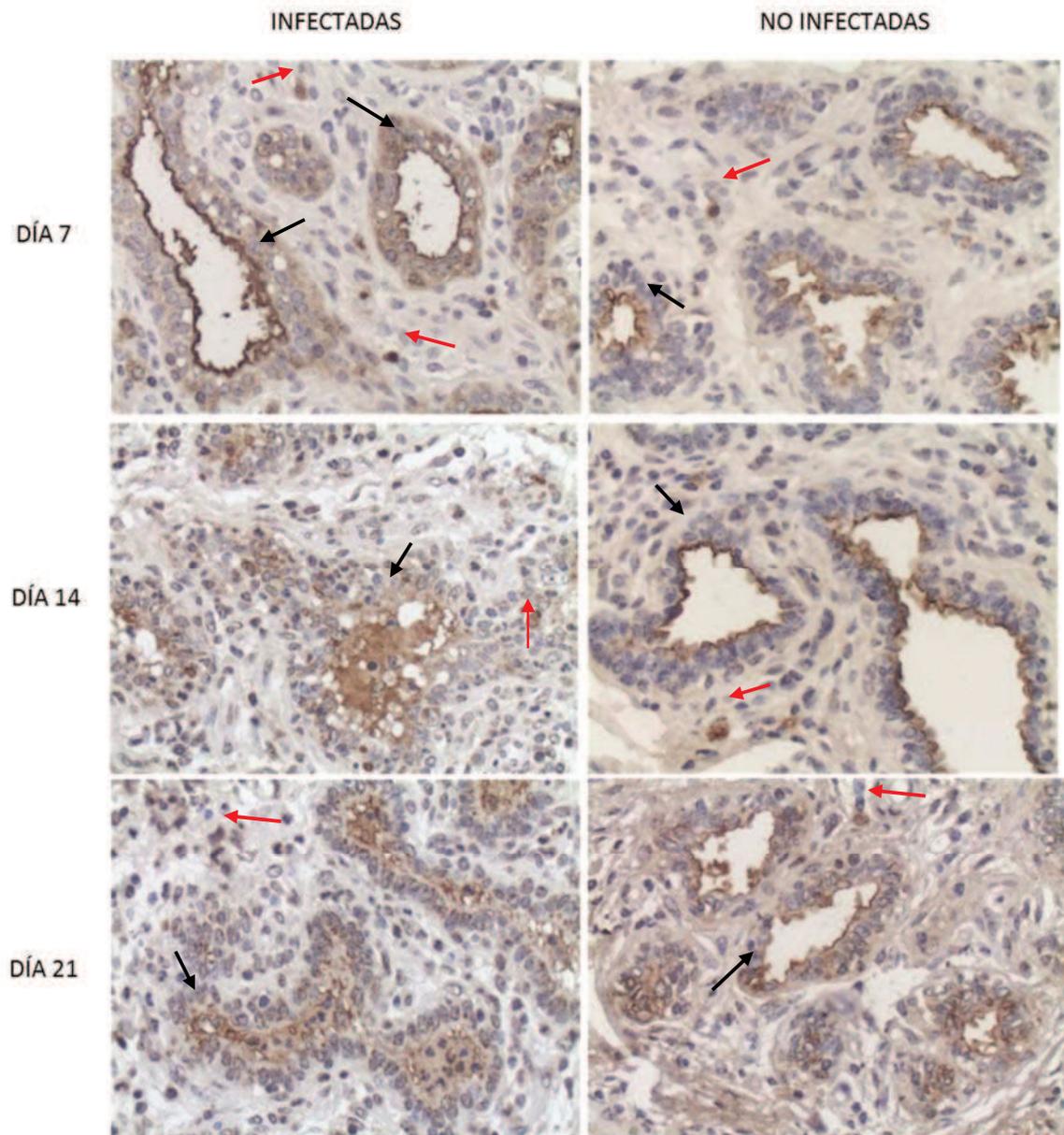


Figura 21: Inmunomarcación para Lf en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma. Aumento: 40X.

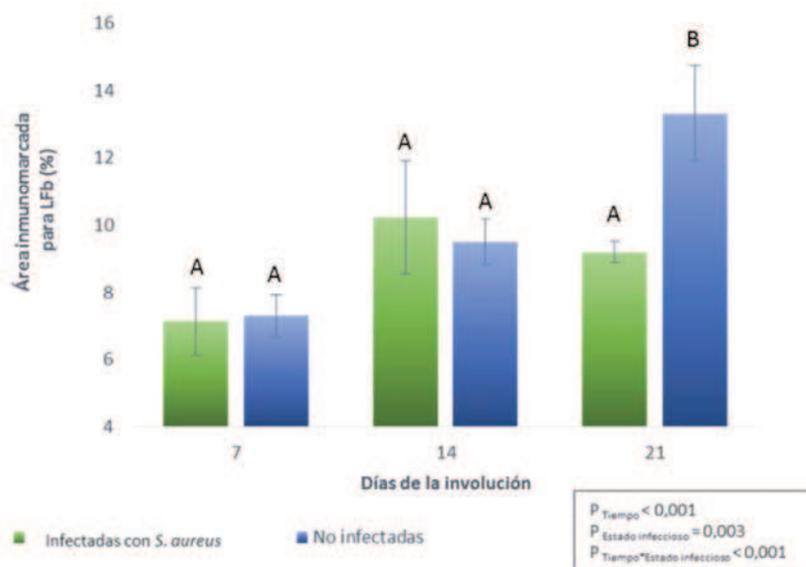


Figura 22: Porcentaje de área inmunomarcada para LF en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

5.2- Caracterización de la respuesta inmune adaptativa

5.2.1- Cuantificación de linfocitos T mediante la expresión de CD2

La identificación de linfocitos T en tejido mamario se realizó mediante la expresión de CD2 utilizando un anticuerpo específico. En la figura 23 se observan los linfocitos T inmunomarcados para los diferentes tiempos de la involución en cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados. La marcación intensa se detectó a nivel del citoplasma de los linfocitos T. Los mismos se distribuyeron principalmente en el tejido conjuntivo del estroma mamario y en menor número en la luz de alvéolos y conductos. En los cuartos mamarios infectados con *S. aureus* los linfocitos T se distribuyeron formando acúmulos en el tejido conjuntivo interalveolar (Figura 23).

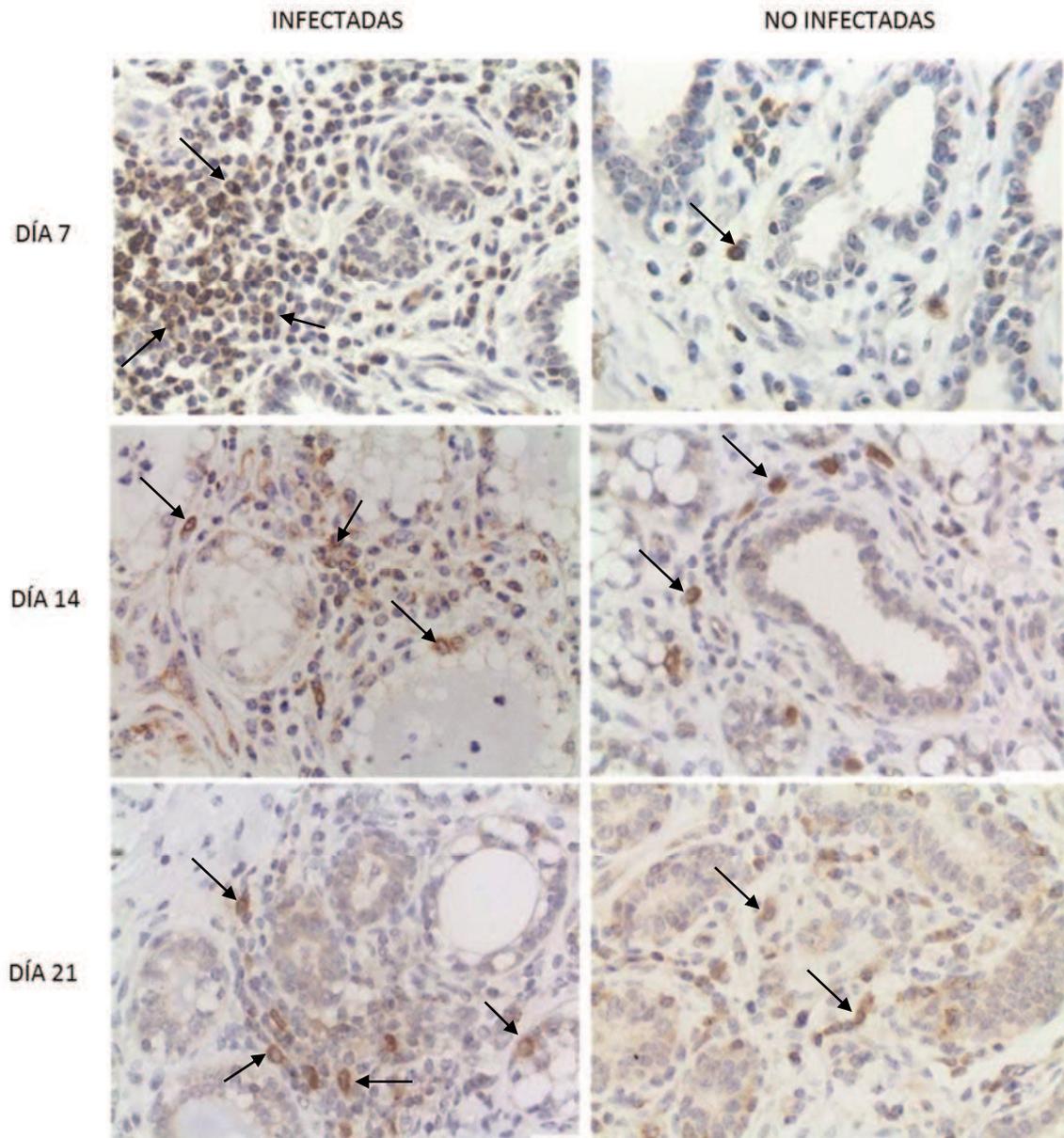


Figura 23: Inmunomarcación de linfocitos T CD2 positivos en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células intensamente marcadas con el cromógeno. Aumento: 40X.

El número de linfocitos T/mm² se grafica en la figura 24. El número de linfocitos T se vio influenciado por los periodos de la involución ($p=0,004$) y por el proceso infeccioso ($p<0,001$), observándose además interacción entre ambos factores ($p<0,001$). En cuartos infectados, a los 7 y 14 días el número de linfocitos T fue mayor al hallado en cuartos sanos ($p<0,001$), no así al día 21 donde el número de células fue similar ($p=0,522$).

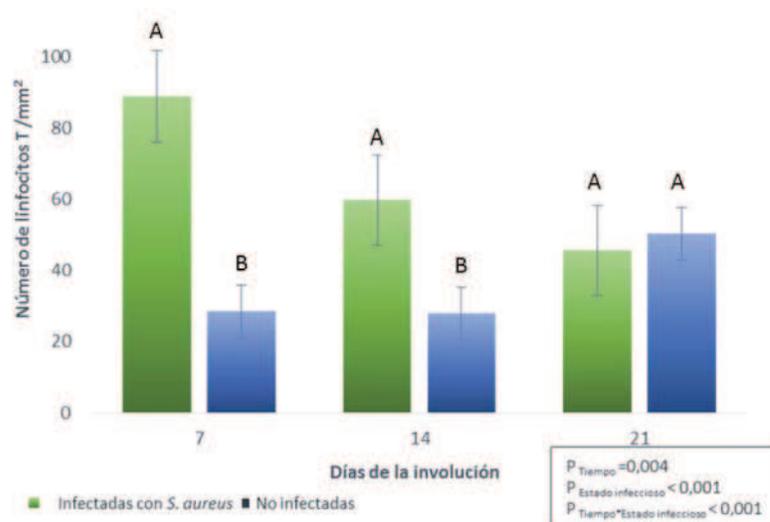


Figura 24: Número de linfocitos T por unidad de área (mm^2) marcados con CD2 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias del número de linfocitos T/ mm^2 en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

5.2.2- Cuantificación de linfocitos B mediante la expresión de CD79

La identificación de linfocitos B en tejido mamario se realizó mediante la expresión de CD79 utilizando un anticuerpo específico. En la figura 25 se observan los linfocitos B inmunomarcados para los diferentes tiempos de la involución en cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados. La marcación positiva se asoció al citoplasma de los linfocitos distribuyéndose principalmente en el tejido conjuntivo interalveolar. En la figura 26 se grafica el número de linfocitos B/ mm^2 . El número de linfocitos se vio influenciado por los periodos de la involución evaluados ($p < 0,001$) y por el proceso infeccioso ($p < 0,001$), observándose interacción significativa entre ambos factores ($p < 0,001$). En cuartos infectados, el número de linfocitos B fue mayor con respecto a sanos en todos los periodos de la involución evaluados ($p < 0,001$).

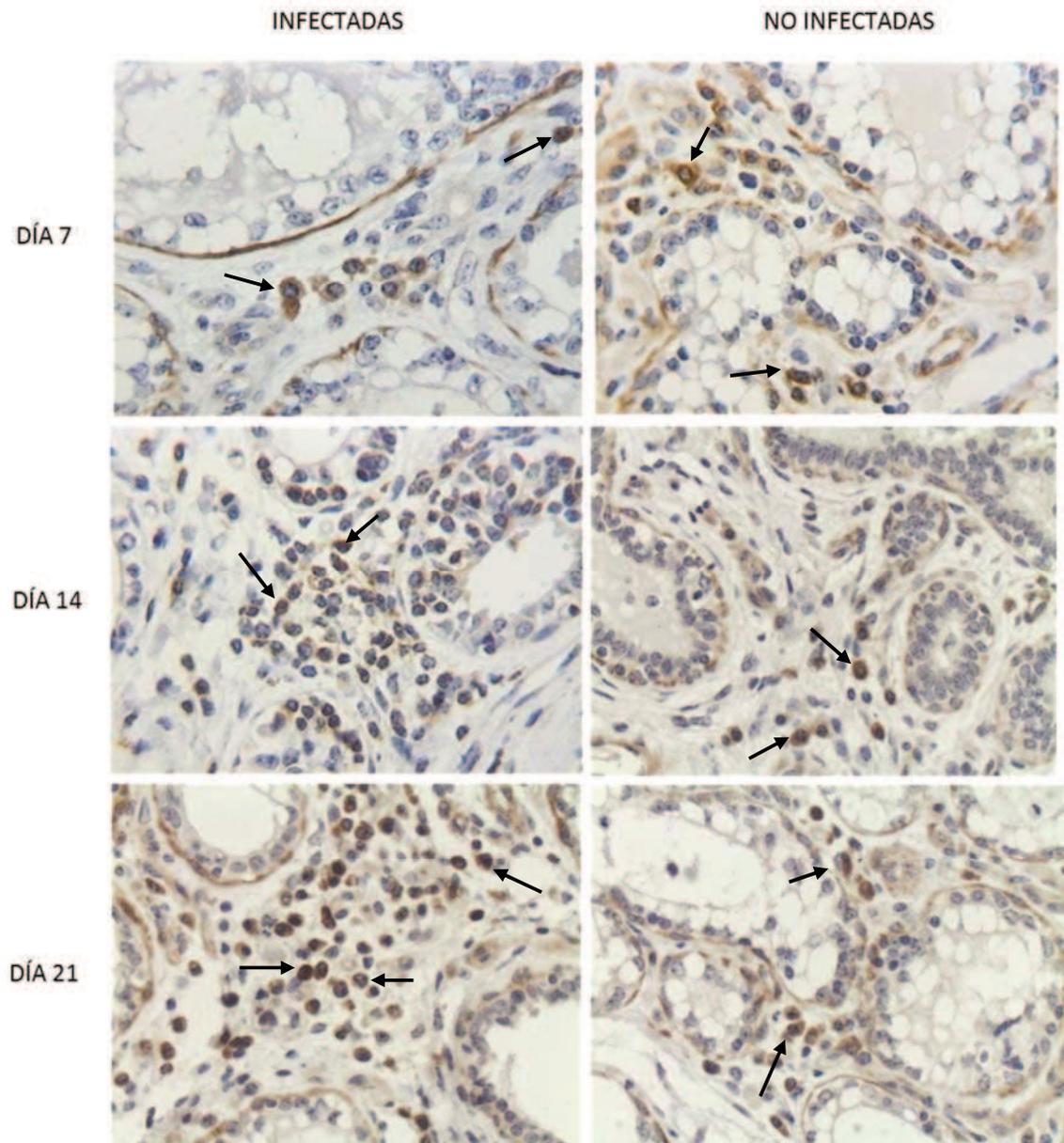


Figura 25: Inmunomarcación de linfocitos B CD79 positivos en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células intensamente marcadas. Aumento: 40X.

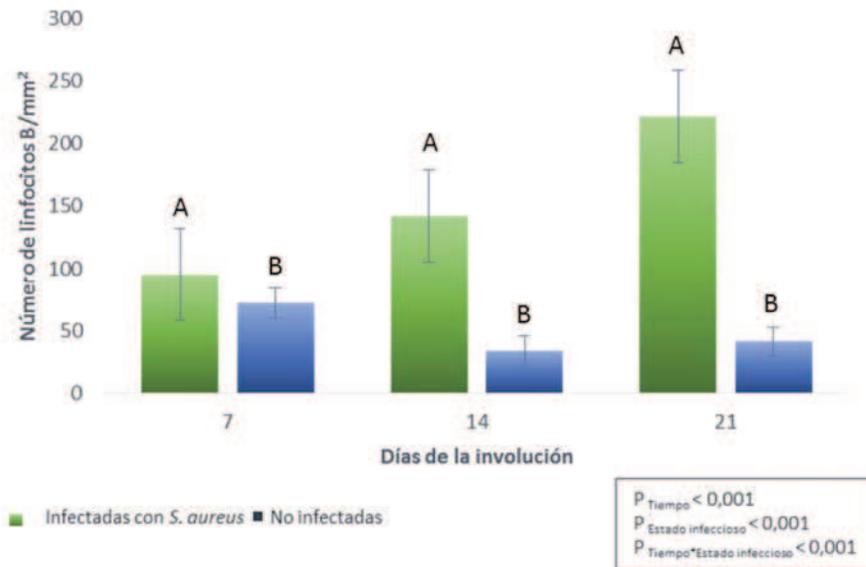


Figura 26: Número de linfocitos B por unidad de área (mm^2) marcados con CD79 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias del número de linfocitos T/ mm^2 en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

Conclusiones parciales

En relación a la respuesta inmune innata:

- Los receptores de reconocimiento de patrones, TLR-2 y TLR-4, mostraron mayores porcentajes de área inmunomarcada en cuartos infectados respecto a los sanos en todos los periodos de la involución evaluados, existiendo un efecto del tiempo y del estado infeccioso.
- Para TLR-2, los mayores porcentajes de inmunomarcación se observaron al día 7 de la involución, disminuyendo en forma gradual a lo largo del periodo de muestreo, tanto en cuartos infectados como en sanos.
- La inmunoexpresión de TLR-4 fue mayor en cuartos con infecciones crónicas que en cuartos sanos en todos los periodos, observándose el mayor porcentaje de inmunomarcación al día 7 de la involución en cuartos infectados.
- El número de monocitos-macrófagos CD14+ se vio influenciado por el tiempo y por el proceso infeccioso. Al día 7 y 21 de la involución el número de células fue mayor en cuartos infectados en comparación con no infectados; no así al día 14 donde no se observaron diferencias entre cuartos infectados y sanos. En infectados, el mayor número de monocitos se registró al día 7, para disminuir gradualmente hacia el día 21 de la involución.
- Entre las citoquinas proinflamatorias evaluadas, IL-1 α y TNF- α mostraron en general mayores porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos infectados crónicos en relación a los cuartos no infectados. Para TNF- α los porcentajes de inmunomarcación fueron mayores en cuartos infectados con respecto a sanos en todos los periodos de la involución evaluados; mientras que, para IL-1 α el grupo de infectados presentó mayor inmunoexpresión sólo al día 7 y 14 de la involución. Para IL-6, no se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados.

- La IL-17 presentó mayores porcentajes de marcación en los cuartos infectados respecto a los sanos a los días 14 y 21, mientras que al día 7 no se observaron diferencias.
- La inmunomarcación de Lf se vio influenciada por la infección y por el tiempo, disminuyendo significativamente al día 21 de la involución en cuartos infectados con respecto a no infectados.

En relación a la respuesta inmune adaptativa:

- El número de linfocitos T se vio influenciado por los periodos de la involución y por el proceso infeccioso, observándose además interacción significativa entre ambos factores. En cuartos infectados, a los 7 y 14 días el número de linfocitos T fue mayor al hallado en cuartos sanos, no así al día 21 donde el número de células fue similar.
- El número de linfocitos B fue mayor en cuartos infectados con respecto a no infectados en todos los periodos de la involución evaluados. En cuartos infectados, el número de células inmunes aumentó de manera progresiva desde el día 7 al 21 de la involución.

Objetivo específico Nro. 2: Caracterizar el nivel de citoquinas en secreciones mamarias de cuartos sanos y con infecciones crónicas por *S. aureus* durante la involución activa.

5.3- Cuantificación de los niveles de citoquinas en secreción mamaria

5.3.1- IL-1 β

En la figura 27 se muestran las concentraciones de IL-1 β promedios en secreción mamaria de cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados a diferentes tiempos luego de la interrupción de la lactancia.

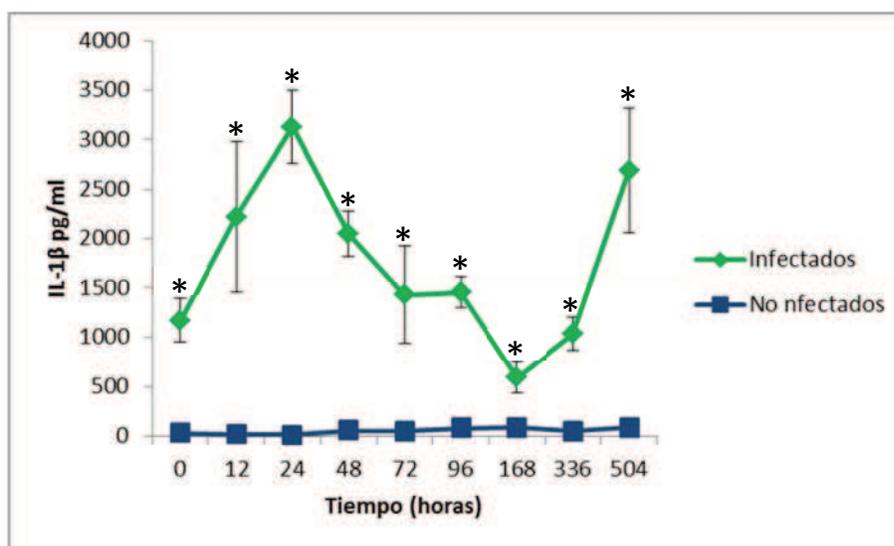


Figura 27: Medias de las concentraciones de IL-1 β en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* y no infectados a las 0 (muestra pre secado), 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336 y 504 hs luego de la interrupción de la lactancia \pm desvío estándar (DS). *, muestran diferencias significativas entre infectados y no infectados en el mismo punto del tiempo ($p < 0.05$).

Las concentraciones de IL-1 β en secreción mamaria fueron mayores en cuartos infectados con respecto a no infectados en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). En secreciones mamarias de cuartos infectados, se observó un aumento gradual en las concentraciones de esta citoquina desde la hora 0 (pre secado) hasta las 24 hs posteriores al secado alcanzando en este tiempo las concentraciones máximas.

Posteriormente, las concentraciones de esta citoquina disminuyeron en forma gradual hasta las 168 hs (7 días) post secado para ascender nuevamente en forma gradual hasta las 504 hs (21 días) post secado alcanzando valores similares a los observados a las 24 horas. En secreciones mamarias de cuartos no infectados, las concentraciones de IL-1 β se mantuvieron sin modificaciones a lo largo del tiempo de muestreo.

5.3.2- IL-4

En la figura 28 se muestran las concentraciones de IL-4 promedios en secreción mamaria de cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados a diferentes tiempos luego de la interrupción de la lactancia.

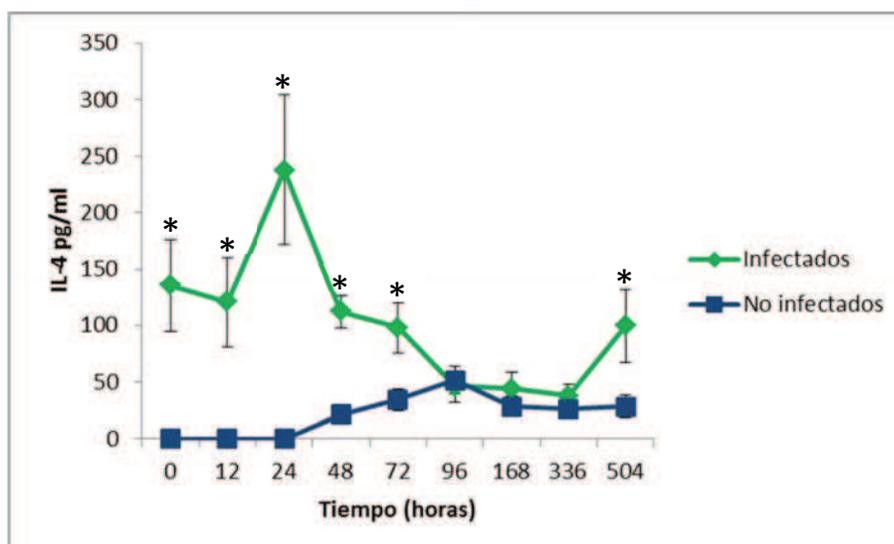


Figura 28: Medias de las concentraciones de IL-4 en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* y no infectados a las 0 (muestra pre secado), 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336 y 504 hs luego de la interrupción de la lactancia \pm desvío estándar (DS). *, muestran diferencias significativas entre infectados y no infectados en el mismo punto del tiempo ($p < 0.05$).

Las concentraciones de IL-4 en secreción mamaria fueron mayores en cuartos infectados con respecto a no infectados ($p < 0,001$) a lo largo del periodo de muestreo. En secreciones mamarias de cuantos infectados, los niveles máximos de esta citoquina se observaron a las 24 hs post secado, para descender gradualmente hasta las 96 hs post secado y alcanzar valores similares a los del grupo no infectado. A los 7

y 14 días (336 hs) post secado no se observaron diferencias en los niveles de IL-4 entre infectados y no infectados, mientras que a los 21 días los niveles de esta citoquina alcanzaron concentraciones superiores en infectados respecto a no infectados ($p < 0,05$). En secreciones mamarias de cuartos no infectados, la IL 4 se detectó a partir de las 48 hs posteriores al secado para alcanzar sus máximos niveles a las 96 hs post secado.

5.3.3- IL-6

En la figura 29 se muestran las concentraciones de IL-6 promedios en secreción mamaria de cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados a diferentes tiempos luego de la interrupción de la lactancia.

Las concentraciones de IL-6 en secreción mamaria fueron mayores en cuartos infectados con respecto a no infectados en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). En secreciones provenientes de cuartos infectados, los niveles de IL-6 fueron en aumento con el progreso de la involución, alcanzándose los mayores niveles a los 14 días post secado. En secreciones mamarias provenientes de cuartos no infectados, la IL-4 se detectó a partir de las 72 hs posteriores al secado para alcanzar sus máximos niveles a los 7 días post secado.

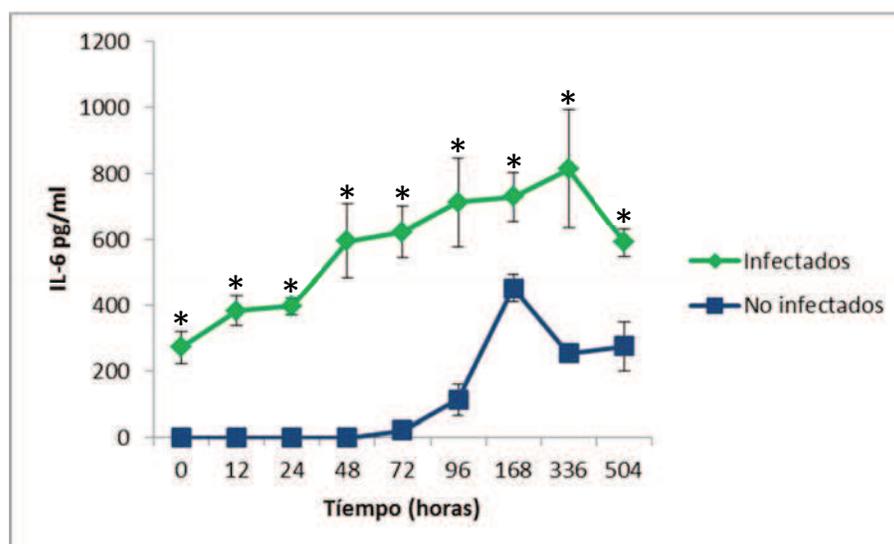


Figura 29: Medias de las concentraciones de IL-6 en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* y no infectados a las 0 (muestra pre secado), 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336 y 504 hs luego de la interrupción de la lactancia \pm desvío estándar (DS). *, muestran diferencias significativas entre infectados y no infectados en el mismo punto del tiempo ($p < 0,05$).

Conclusiones parciales

En relación a los niveles de citoquinas en secreciones mamarias de cuartos sanos y con infecciones crónicas por S. aureus durante la involución activa.

- Las concentraciones de IL-1 β en secreción mamaria fueron mayores en cuartos infectados con respecto a no infectados en todos los periodos evaluados. En las secreciones mamarias de cuartos no infectados, no se presentaron modificaciones en los niveles para esta citoquina a lo largo del tiempo de muestreo, mientras que en los cuartos de animales infectados crónicos se produjeron aumentos y disminuciones, siendo a las 24 hs y al día 21 los periodos en los cuales se registraron las mayores concentraciones.

- Las concentraciones de IL-4 en secreciones mamarias de cuartos infectados fueron mayores a las observadas en cuartos no infectados en todos los tiempos evaluados, salvo a los 7 y 14 días, donde fueron similares, registrándose la máxima concentración a las 24 hs post secado en cuartos infectados. En no infectados, la citoquina se detectó a partir de las 48 hs y sus niveles fueron máximos a las 96 hs.

- Los niveles de IL-6 fueron en progresivo aumento en secreciones provenientes de cuartos infectados, alcanzándose los mayores niveles a los 14 días post secado. En secreciones mamarias de cuartos no infectados, la citoquina se detectó a partir de las 72 hs post secado para alcanzar sus máximos niveles a los 7 días post secado.

*Objetivo específico Nro. 3: Evaluar la expresión proteica de componentes de la subfamilia de TGF- β , de colágeno I y los cambios morfométricos del parénquima y estroma mamario, estableciendo diferencias en cuartos sanos e infectados con *S. aureus*.*

5.4- Expresión de componentes de la subfamilia de TGF- β

En las figuras 30, 32 y 34 se observa el patrón de marcación para tres de los componentes de la familia TGF- β evaluados en este trabajo. En dichas figuras se puede apreciar que la inmunomarcación para TGF- β 1, 2 y 3, se asoció a estructuras del parénquima y del estroma mamario, observándose reacción intensa en el citoplasma de las células epiteliales que revisten alvéolos y conductos mamarios. El citoplasma de las células mioepiteliales que rodean los conductos y alvéolos presentó tinción moderada para las tres isoformas de TGF- β evaluadas. Células del estroma (fibroblastos y células endoteliales), componentes de la matriz extracelular (fibras colágenas) y células del sistema inmune (monocitos-macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), mostraron tinción intensa para las tres isoformas evaluadas.

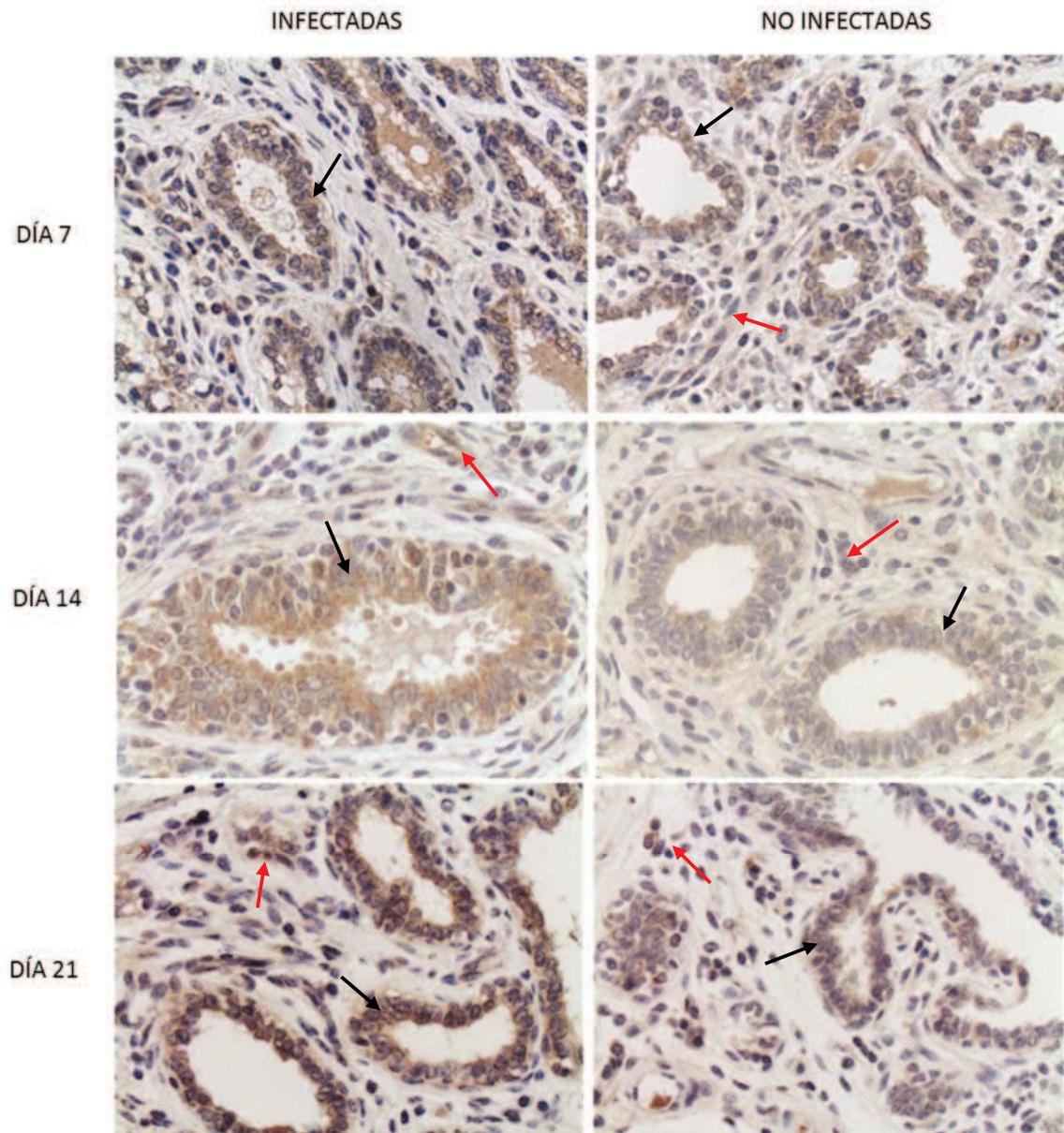


Figura 30: Inmunomarcación para TGF- β 1 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma y componentes de la matriz extracelular. Aumento: 40X.

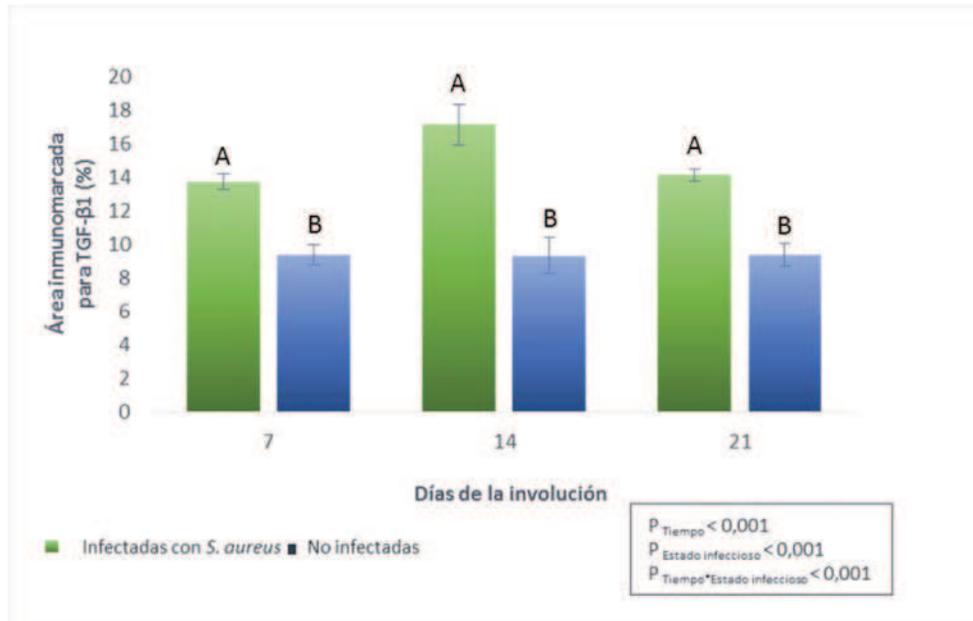


Figura 31: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

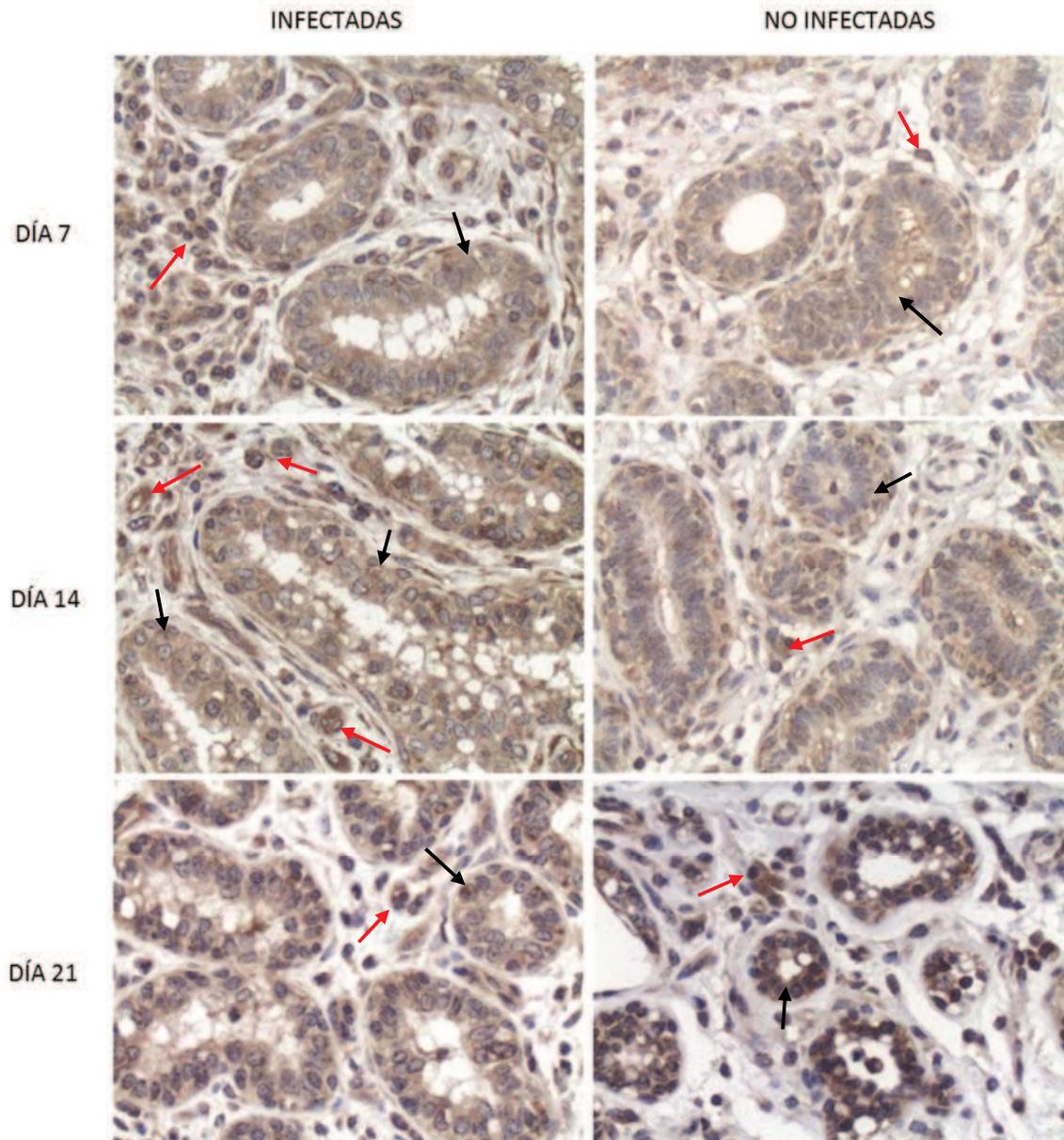


Figura 32: Inmunomarcación para TGF- β 2 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma y componentes de la matriz extracelular. Aumento: 40X.

Los porcentajes de área inmunomarcada para TGF- β 2 en el tejido mamario, representados en la figura 33, fueron mayores en cuartos infectados por *S. aureus* que en los cuartos controles no infectados ($p < 0,001$) y no se vieron afectados por el tiempo de muestreo ($p = 0,587$). No hubo interacción entre el estado infeccioso y el tiempo de toma de muestras ($p = 0,128$). Los porcentajes de área inmunomarcada para

TGF- β 2 fueron mayores en cuartos infectados por *S. aureus* con respecto a los no infectados en todos los periodos evaluados (7 ds, $p=0,002$; 14 ds, $p<0,001$; 21 ds, $p<0,001$).

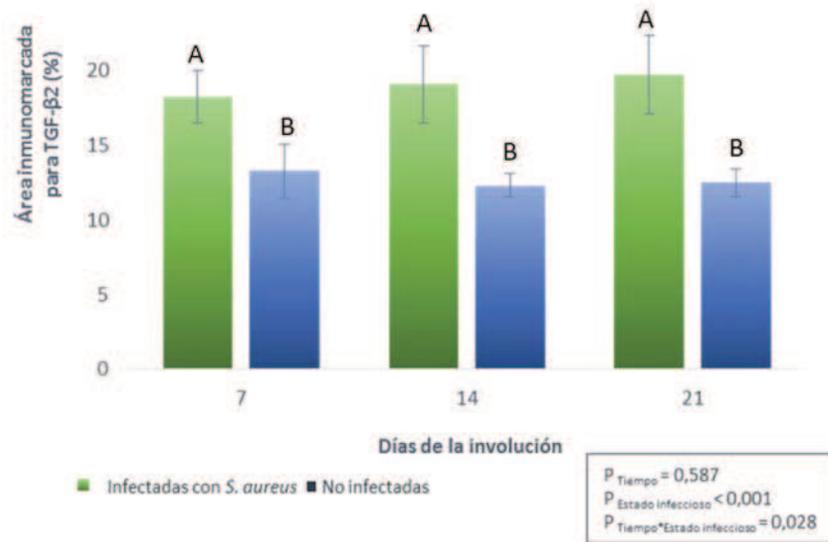


Figura 33: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p<0,05$).

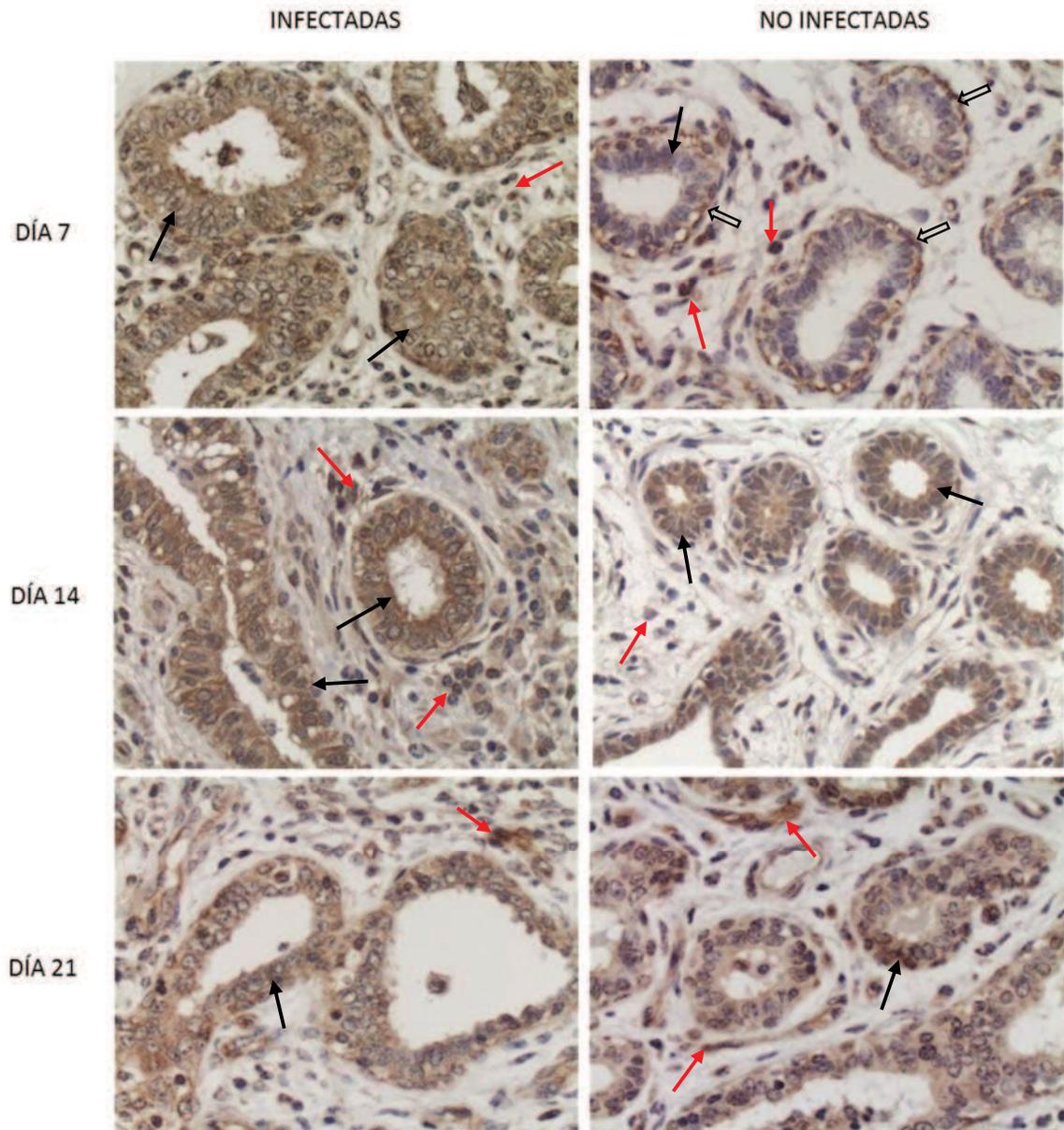


Figura 34: Inmunomarcación para TGF- β 3 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma y componentes de la matriz extracelular. Las flechas transparentes indican células mioepiteliales inmunorreactivas. Aumento: 40X.

Los porcentajes de área inmunomarcada para TGF- β 3 en tejido mamario, representados en la figura 35, fueron mayores en cuartos infectados por *S. aureus* que en los cuartos no infectados ($p < 0,001$), viéndose afectados por el tiempo de muestreo

($p=0,004$). Hubo una significativa interacción entre el estado infeccioso y el tiempo de toma de muestras ($p=0,015$). En cuartos mamarios infectados, los porcentajes de marcación para TGF- β 3 fueron mayores en relación a los no infectados a los 7, 14 y 21 ds de involución ($p<0,001$). La mayor expresión de la proteína en cuartos infectados se observó a los 14 ds de la involución ($p<0,05$).

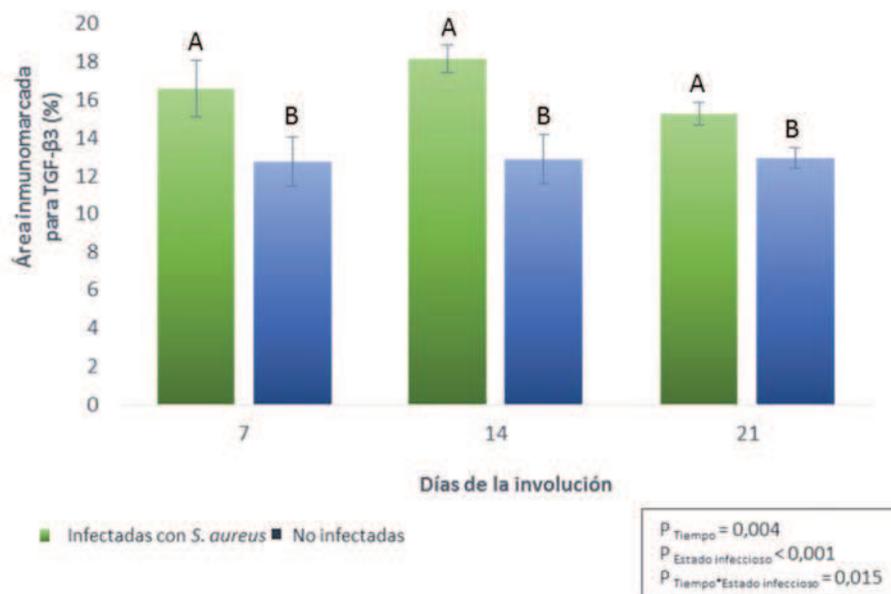


Figura 35: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p<0,05$).

En cuanto a los receptores de la familia TGF- β evaluados, TGF- β R1 y R3, la marcación, como se observa en las figuras 36 y 38, estuvo principalmente asociada al citoplasma de las células epiteliales que revisten conductos y alveolos y a estructuras del estroma intralobulillar e interlobulillar. Las células estromales como fibroblastos mostraron tinción citoplasmática perinuclear moderada. Las células inmunes (monocitos-macrófagos, linfocitos y células plasmáticas) mostraron tinción intensa. La marcación del citoplasma de las células mioepiteliales fue intensa para TGF- β R3 y débil para TGF- β R1.

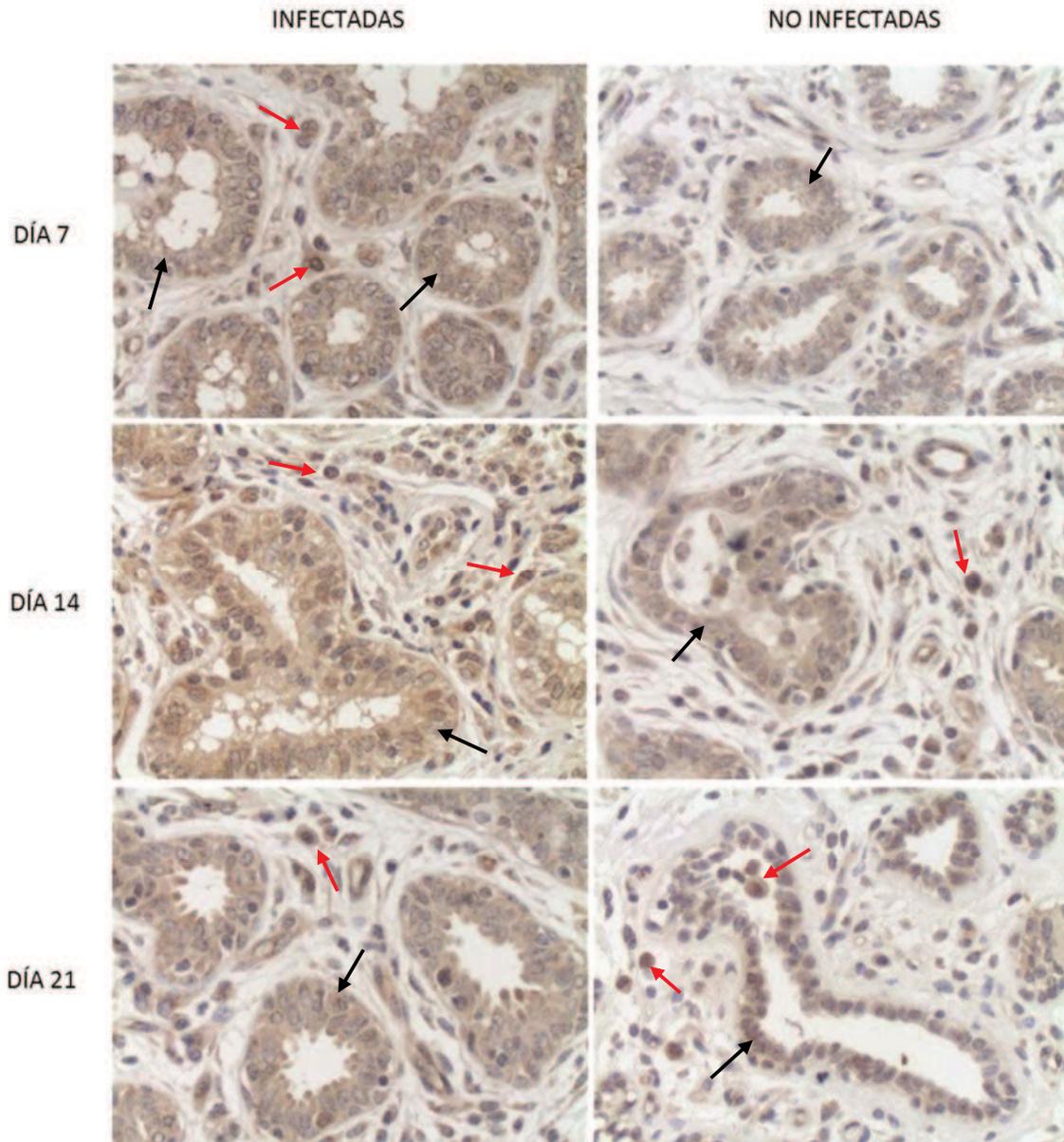


Figura 36: Inmunomarcación para TGF- β 1 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma y componentes de la matriz extracelular. Aumento: 40X.

Los porcentajes de inmunomarcación para TGF- β 1 y TGF- β 3 se vieron afectados por la infección por *S. aureus* ($p < 0,001$) y por el tiempo de muestreo ($p < 0,001$). La interacción entre el estado infeccioso y el tiempo de toma de muestras

fue significativa para ambos receptores ($p < 0,001$). A los 7, 14 y 21 d de involución los porcentajes de área inmunomarcada para TGF- β R1 y TGF- β R3 fueron mayores en infectados con *S. aureus* que en no infectadas ($p < 0,001$). Para ambos receptores la mayor expresión se observó en cuartos infectados a los 14 ds de involución ($p < 0,05$; Figuras 37 y 39).

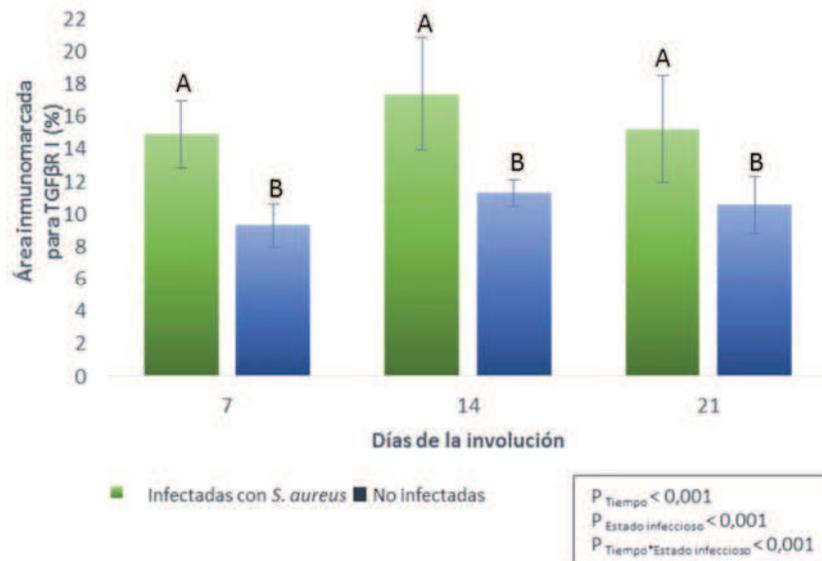


Figura 37: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β R1 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

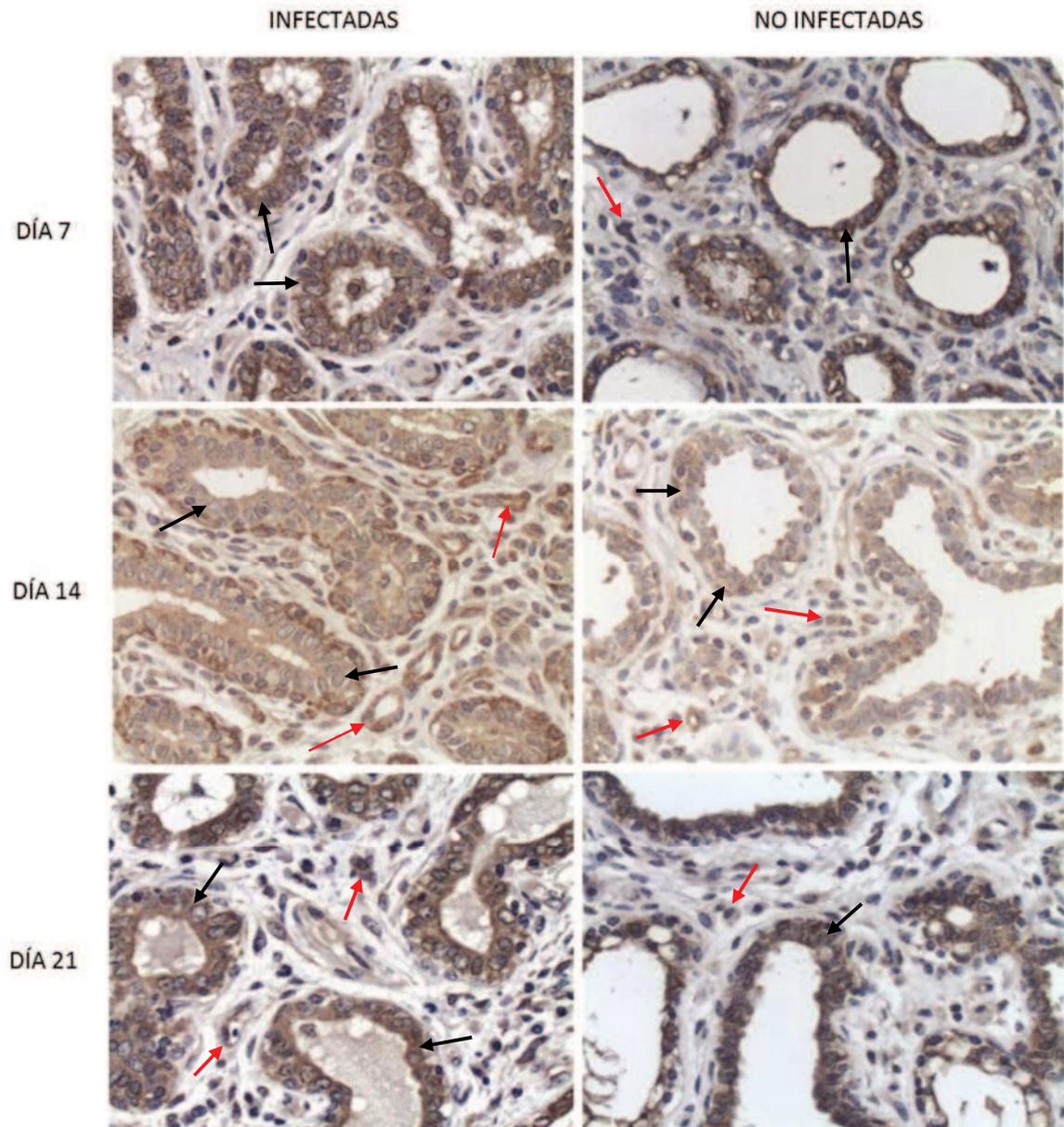


Figura 38: Inmunomarcación para TGF- β 3 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras señalan células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas indican células del sistema inmune ubicadas en estroma y componentes de la matriz extracelular. Aumento: 40X.

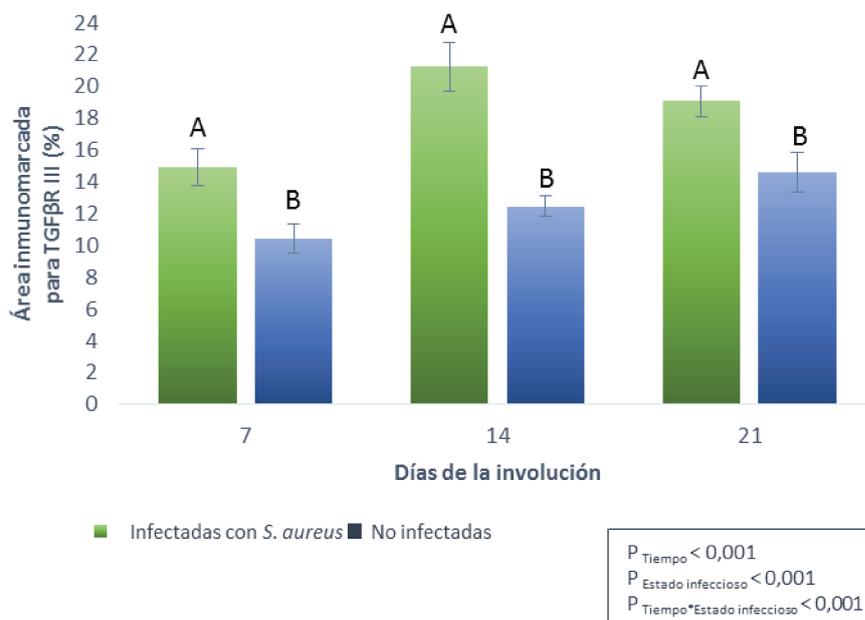


Figura 39: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

En la figura 40 se observan los resultados de los western blot realizados a fines de evaluar la especificidad de los anticuerpos utilizados en IHQ. En la figura 40A, correspondiente a TGF- β 1, se puede observar una banda a la altura de los 25 kDa. En la figura 40B se observa una banda a la altura de los 25 kDa correspondiente a TGF- β 2. En 40C, correspondiente a TGF- β 3, se observa una banda a la altura de los 12.5 kDa. En 40D, correspondiente a TGF- β R1, se observa una banda a los 56 kDa. En 40E, correspondiente a TGF- β R3, la banda se encuentra a los 93 kDa.

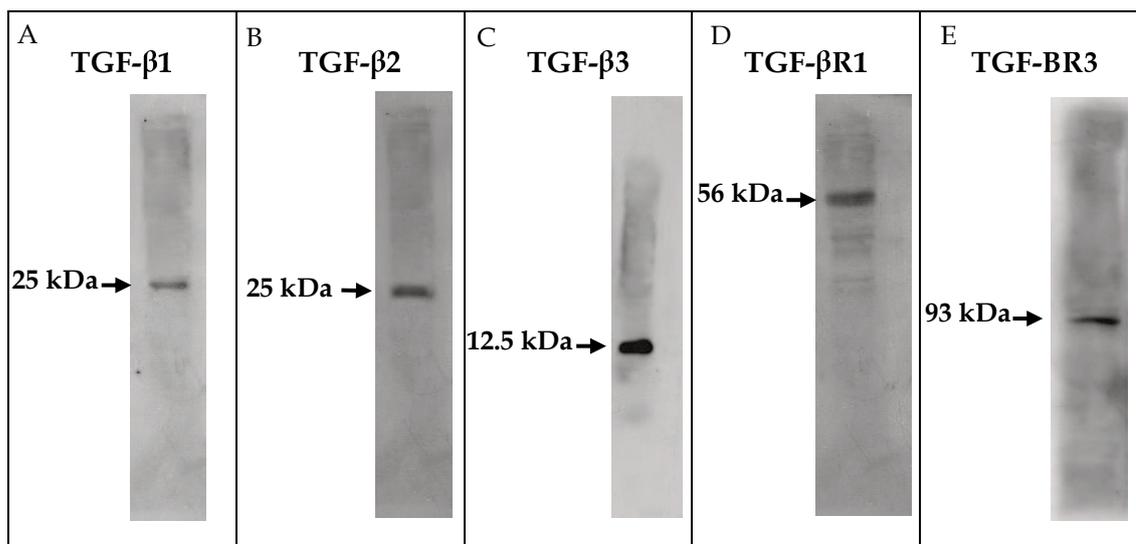


Figura 40: Western blot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ (anti- TGF- β 1, 2, 3 y los receptores 1 y 3) en tejido mamario.

5.5- Expresión proteica de colágeno I

La marcación de colágeno I se observó en todos los cuartos, tanto en los infectados con *S. aureus* como en los no infectados, durante todos los periodos de la involución evaluados. La expresión de esta proteína se asoció al estroma interalveolar e interlobulillar. Imágenes representativas de la expresión de colágeno I en cuartos mamarios infectados y no infectados se observan en las figuras 41 y 42.

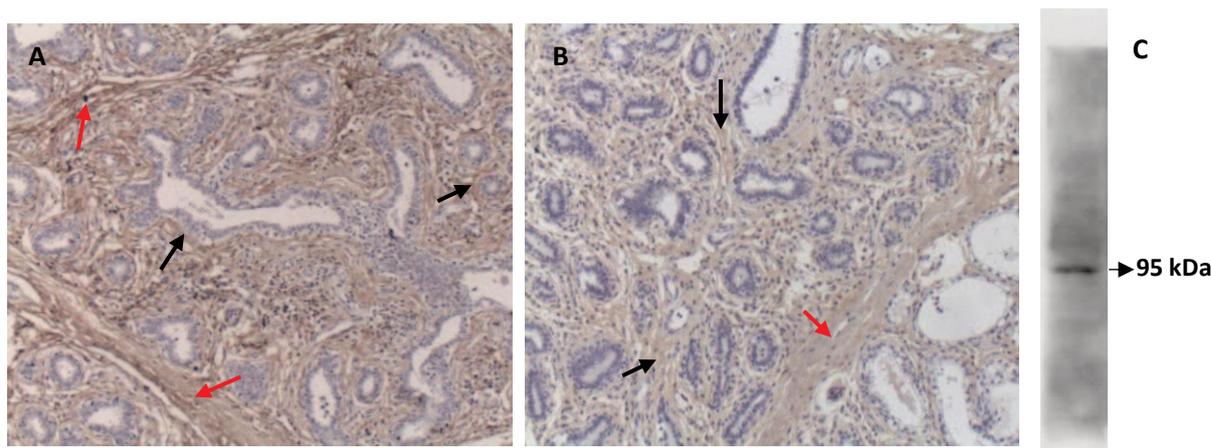


Figura 41: Imágenes representativas de la inmunomarcación para colágeno I en GM crónicamente infectada con *S. aureus* (A) y no infectada (B) a los 14 días de la involución. Flechas negras indican fibras de colágeno tipo I intensamente marcadas alrededor de alvéolos mamarios y conductos excretores. Flechas rojas señalan haces apretados de fibras de colágeno intensamente marcados en el estroma interlobulillar. Magnificación usada: 10X. (C) Western blot para identificar la especificidad del anticuerpo para IHQ (anti- colágeno I).

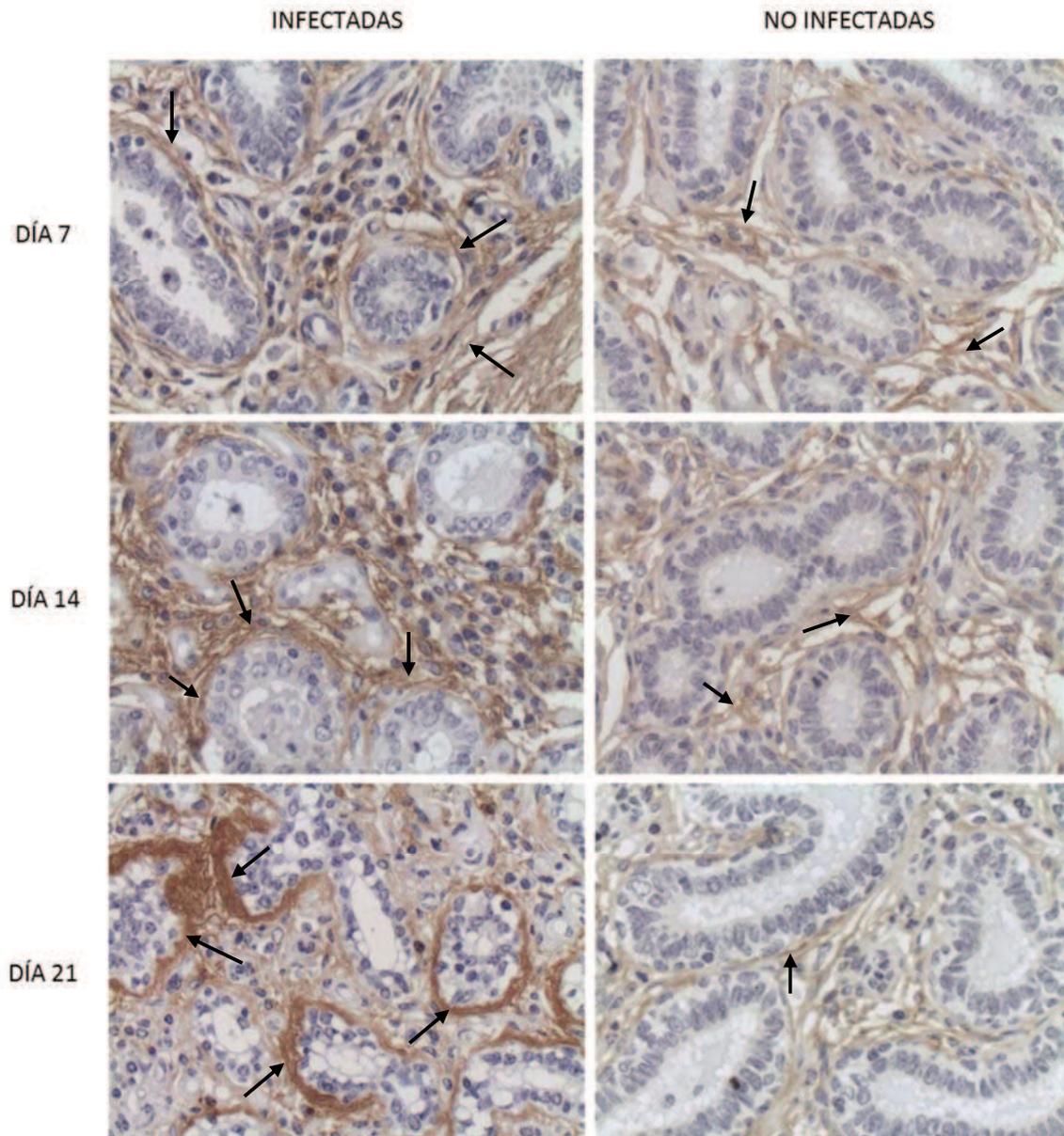


Figura 42: Inmunomarcación para colágeno I en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras indican fibras de colágeno tipo I intensamente marcadas alrededor de alvéolos mamarios y conductos excretores. Aumento: 40X.

En cuartos infectados, se observaron abundantes haces de fibras de colágeno tipo I intensamente marcados distribuidas uniformemente alrededor de los alvéolos mamarios y conductos excretores formando un anillo continuo en la zona adyacente a la membrana basal del epitelio, especialmente evidente al día 21 de la involución (Figura 42). Asimismo, en el estroma interlobulillar se observaron haces apretados de

fibras de colágeno intensamente marcados. En cuartos no infectados, la marcación de las fibras de colágeno localizadas en el tejido conjuntivo que rodea inmediatamente a los alvéolos y conductos y en el estroma intralobulillar fue menos intensa y con una distribución más laxa que la observada en los cuartos infectados. En cuartos no infectados, el estroma interlobulillar mostró marcación intensa y haces apretados de fibras colágenas. El análisis cuantitativo de la expresión de esta proteína se observa en la figura 43.

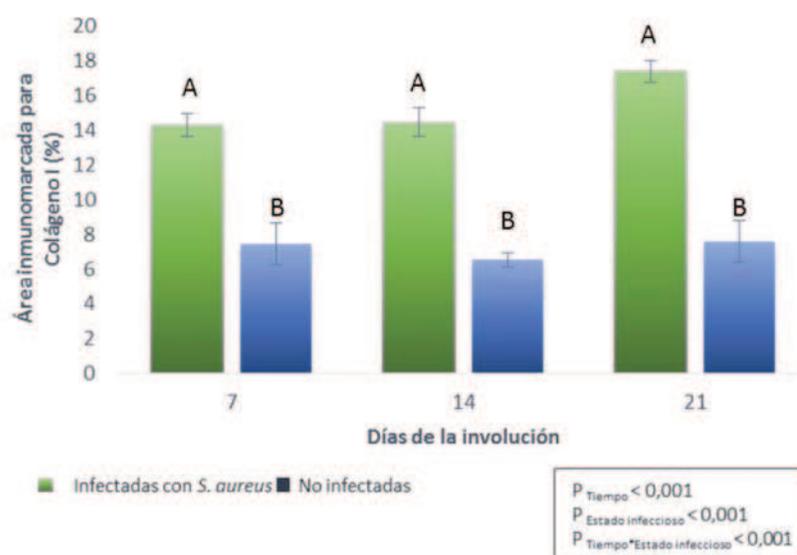


Figura 43: Porcentaje de área inmunomarcada para colágeno I en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

El área inmunomarcada fue mayor en cuartos infectados respecto a los sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$), fue afectada también por el tiempo de muestreo ($p < 0,001$), existiendo además una interacción significativa entre el estado infeccioso y el tiempo de muestreo ($p = 0,001$). Los porcentajes de inmunomarcación fueron mayores en cuartos infectados con respecto a no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución ($p < 0,001$). La mayor expresión de colágeno I en cuartos infectados se detectó al día 21 de la involución ($p < 0,05$) (Figura 43).

5.6- Evaluación de los cambios morfológicos

5.6.1- Área representada por parénquima

Los porcentajes de área ocupada por parénquima en cuartos infectados y no infectados durante la involución se observan en la figura 44. Los porcentajes de parénquima en cuartos infectados fueron mayores a los observados en cuartos sanos ($p < 0,001$), existiendo además un efecto del tiempo ($p < 0,001$), así como una interacción entre el tiempo y el estado infeccioso ($p < 0,001$). A los 7 días de la involución, los porcentajes de área compuesta parénquima fueron menores en cuartos infectados con respecto a los no infectados ($p = 0,018$). A los 14 y 21 días de la involución, los porcentajes de parénquima en cuartos infectados fueron mayores que en no infectados ($p < 0,001$).

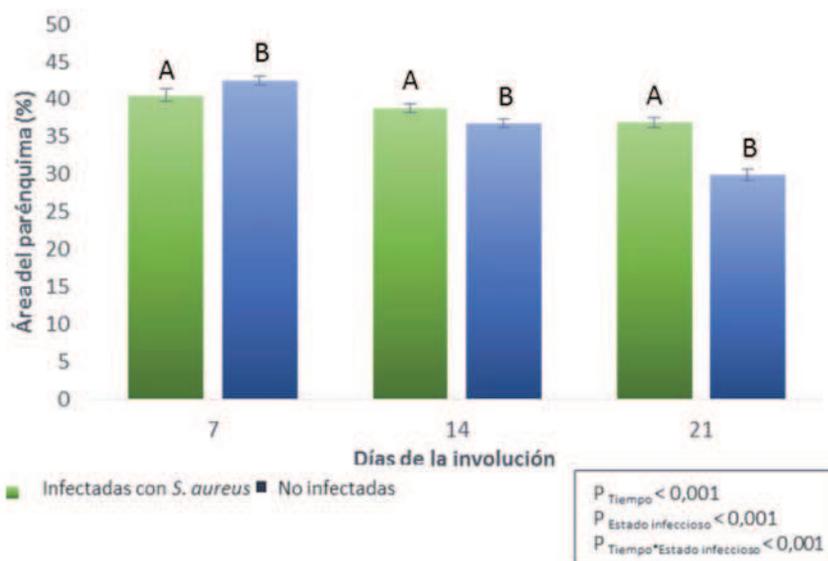


Figura 44: Porcentaje de área representada por parénquima en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área representada por parénquima \pm el desvío estándar (DE) en los cuartos mamarios evaluados. Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,01$).

5.6.2. Área representada por estroma

Área representada por estroma intralobulillar

Se observó un efecto significativo de la infección por *S. aureus* sobre los porcentajes de área representados por el estroma intralobulillar ($p < 0,001$), detectándose mayores porcentajes en cuartos infectados con respecto a no infectados durante todos los periodos evaluados (Figura 45). Por otra parte, los porcentajes de área representada por estroma intralobulillar se vieron afectados por el tiempo de muestreo ($p < 0,001$), observándose además interacción entre el estado infeccioso y el tiempo de muestreo ($p < 0,001$). En cuartos infectados, a los 7, 14 y 21 días de la involución los porcentajes de área de estroma intralobulillar fueron mayores que en cuartos no infectados ($p < 0,001$)

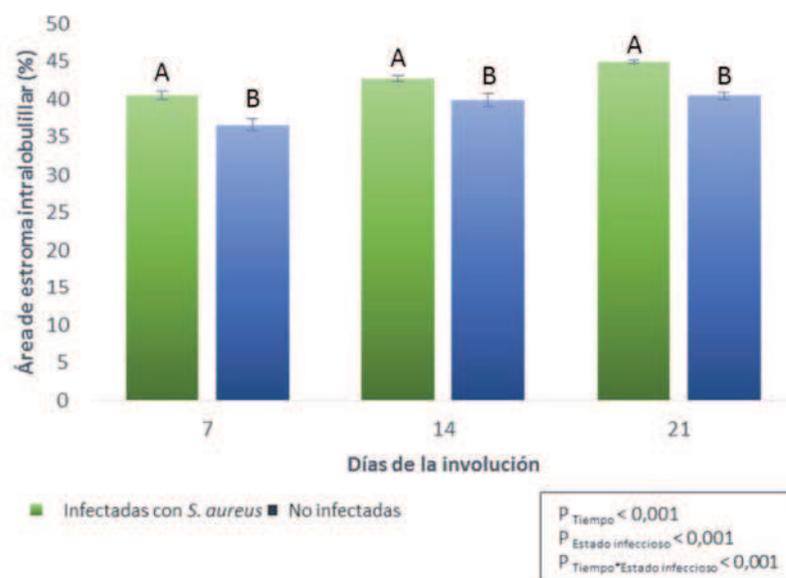


Figura 45: Porcentaje de área representada por estroma intralobulillar en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de áreas de estroma intralobulillar \pm el desvío estándar (DE) en los cuartos mamarios evaluados. Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

Área representada por estroma interlobulillar

Se observó un efecto significativo de la infección por *S. aureus* sobre los porcentajes de área representada por estroma interlobulillar ($p < 0,001$), detectándose menores porcentajes en cuartos infectados con respecto a no infectados durante todos

los periodos de la involución evaluados (Figura 46). Por otra parte, los porcentajes de área representada por estroma interlobulillar se vieron afectados por el tiempo de muestreo ($p < 0,001$), observándose además interacción entre el estado infeccioso y el tiempo de muestreo ($p < 0,001$). En cuartos infectados, a los 7, 14 y 21 días de la involución los porcentajes de área de estroma interlobulillar fueron menores que en cuartos no infectados ($p < 0,001$). En cuartos infectados, los porcentajes de área de estroma interlobulillar fueron similares a lo largo de todo el periodo de muestreo.

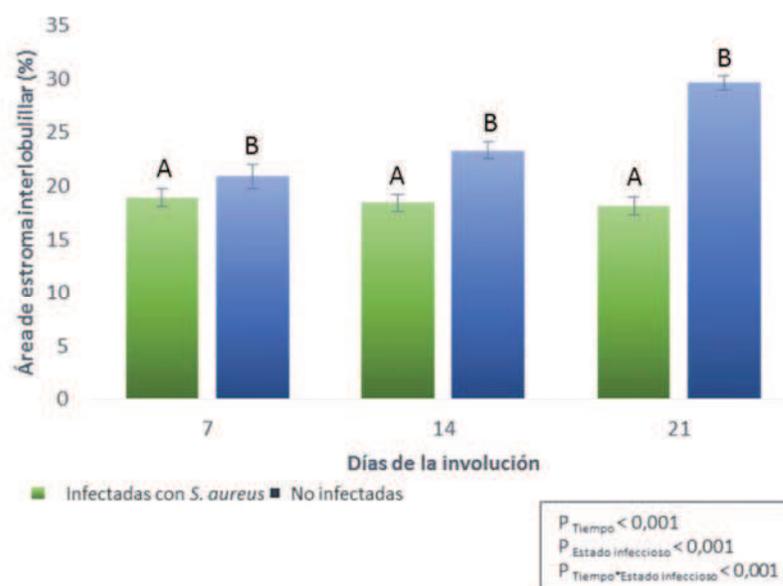


Figura 46: Porcentaje de área representada por el estroma interlobulillar en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área representada por estroma interlobulillar \pm el desvío estándar (DE) en los cuartos mamarios evaluados. Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

Conclusiones parciales

En relación a la expresión proteica de los componentes de la subfamilia TGF- β y colágeno I y a los cambios morfométricos:

- Los porcentajes de área inmunomarcada para los componentes de la subfamilia TGF- β evaluados fueron mayores en animales infectados crónicos respecto a sanos, existiendo en todos los casos un efecto significativo del estado infeccioso.

- En el caso de TGF- β 1 hubo además un efecto del tiempo, y la mayor expresión de la proteína en cuartos infectados se observó a los 14 días de la involución.

- Para TGF- β 2, si bien hubo un efecto del estado infeccioso, ocasionando esto una mayor expresión en infectados, no existió un efecto del tiempo, presentándose valores similares en todos los periodos evaluados, tanto en infectados como en no infectados.

- Los porcentajes de área inmunomarcada para TGF- β 3 en tejido mamario se vieron además afectados por el tiempo de muestreo. Los porcentajes de inmunoexpresión en no infectados se mantuvieron similares durante el periodo evaluado, mientras que en los infectados se observó una mayor expresión de la proteína a los 14 días de la involución.

- Los porcentajes de inmunomarcación para TGF- β R1 y TGF- β R3 se vieron afectados por el tiempo de muestreo, registrándose para ambos receptores una mayor expresión en cuartos infectados a los 14 días de la involución.

- Los porcentajes de área inmunomarcada para colágeno I fueron mayores en cuartos infectados crónicos respecto a sanos en todos los periodos evaluados, detectándose al día 21 de la involución la mayor expresión de esta proteína.

- En cuanto a los análisis morfométricos realizados, los porcentajes de área ocupados por parénquima y estroma intra e interlobulillar se vieron influenciados por el estado infeccioso y por el tiempo de muestreo, existiendo además una interacción entre ambos factores.

- En los cuartos de animales infectados crónicos por *S. aureus*, los mayores porcentajes de área ocupada por parénquima se observaron a los 14 y 21 días, no así al día 7 donde los porcentajes fueron menores que en no infectados.
- Los porcentajes de área ocupados por estroma intralobulillar fueron mayores en cuartos infectados crónicos con respecto a cuartos no infectados durante toda la involución.
- Los porcentajes de área ocupados por estroma interlobulillar fueron mayores en cuartos no infectados con respecto a infectados durante todos los periodos evaluados.

Objetivo específico Nro. 4: Caracterizar los inhibidores intramamarios de la proliferación celular e inductores de la apoptosis y proteínas regulatorias intracelulares, estableciendo diferencias en cuartos sanos e infectados con *S. aureus*.

5.7- Caracterización de la proliferación celular

5.7.1- Inmunomarcación para PCNA

Este anticuerpo presentó un patrón de marcación nuclear. Las células positivas presentaron una tinción con diferentes intensidades de marrón, por lo cual se consideraron como positivas las células con coloración más intensa. Las células positivas se ubicaron tanto en estroma como en parénquima, cuantificándose por separado para ambas áreas del tejido. En la figura 47 se observa la marcación positiva correspondiente.

Como se observa en la figura 48, en el parénquima mamario el análisis de los porcentajes de proliferación, evaluados a través de la expresión nuclear de PCNA, reveló un efecto significativo de la IIM y del tiempo de muestreo ($p < 0,001$), mientras que la interacción entre ambos factores no fue significativa ($p = 0,725$); a su vez en los cuartos infectados los porcentajes de proliferación fueron mayores respecto de los sanos en todos los períodos evaluados ($p < 0,05$).

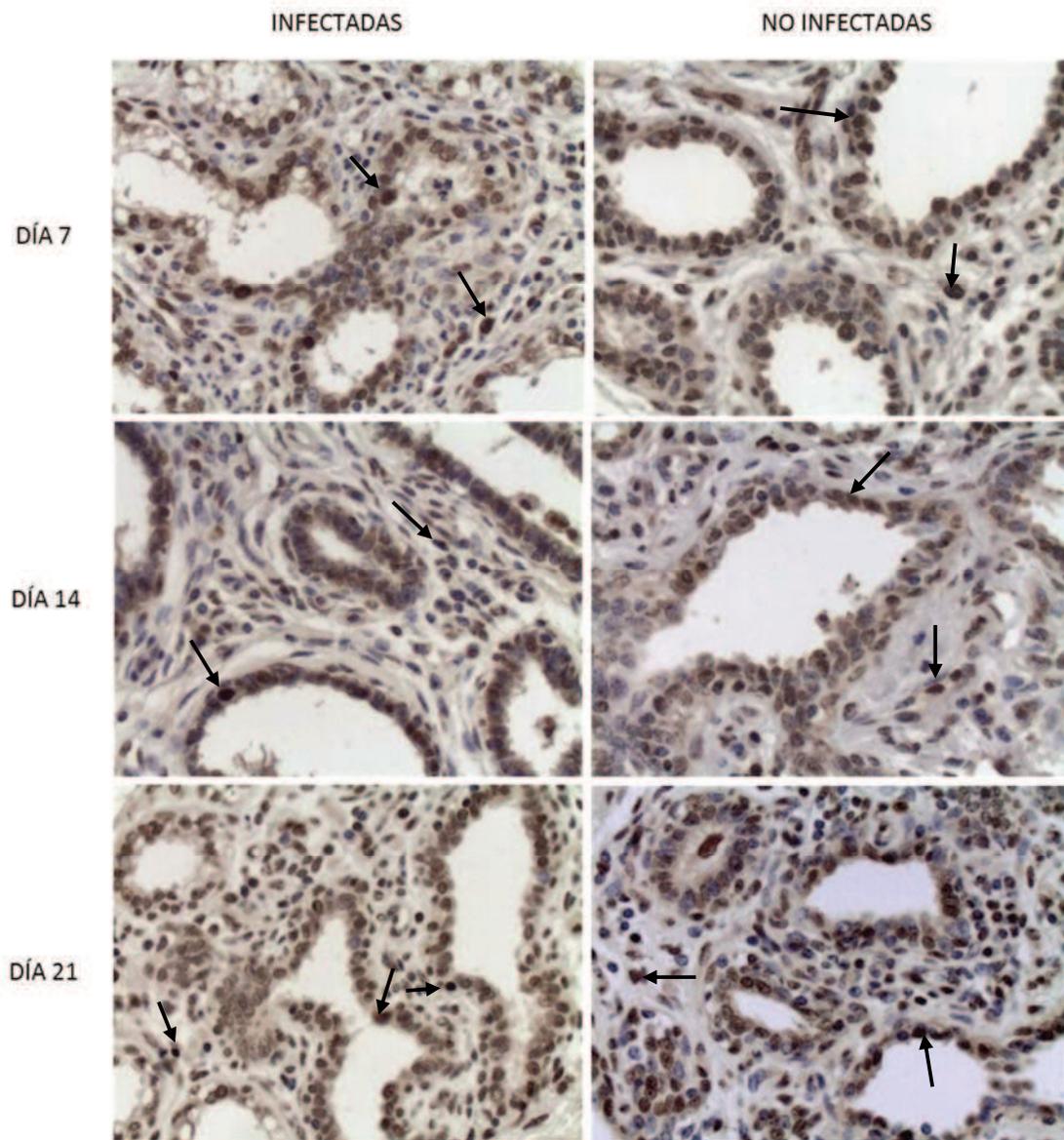


Figura 47: Inmunomarcación de células positivas para PCNA en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas indican núcleos de células epiteliales y estromales intensamente marcadas. Aumento: 40 X.

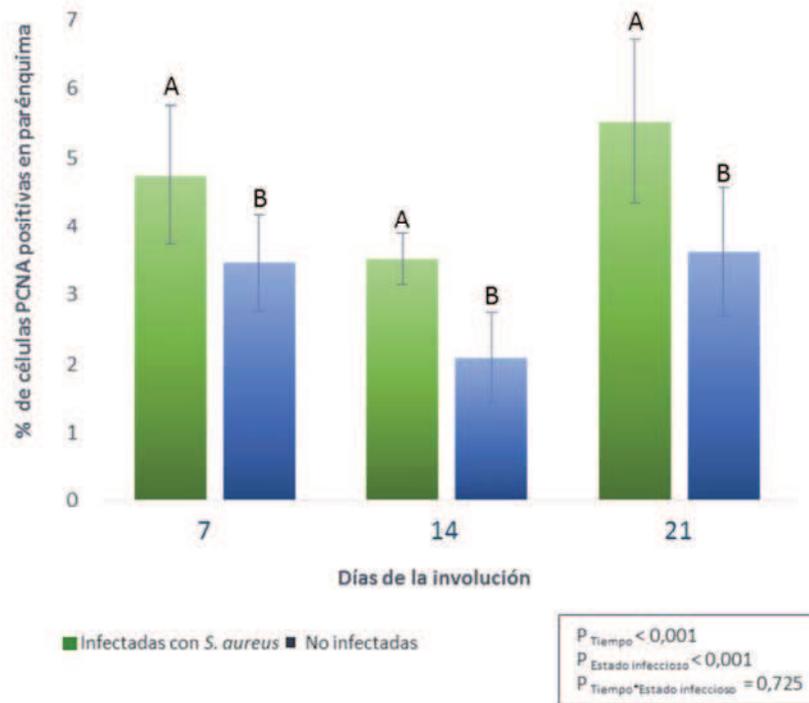


Figura 48: Porcentajes de proliferación evaluados a través de la expresión nuclear de PCNA en parénquima de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de células PCNA positivas en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

En la figura 49 se observa que en el estroma mamario existió un efecto significativo del tiempo de muestreo ($p < 0,001$), mientras que el efecto de la IIM no fue significativo ($p = 0,50$) ni existió interacción ($p = 0,057$); tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de proliferación en entre cuartos infectados y sanos en ninguno de los tiempos evaluados ($p > 0,05$).

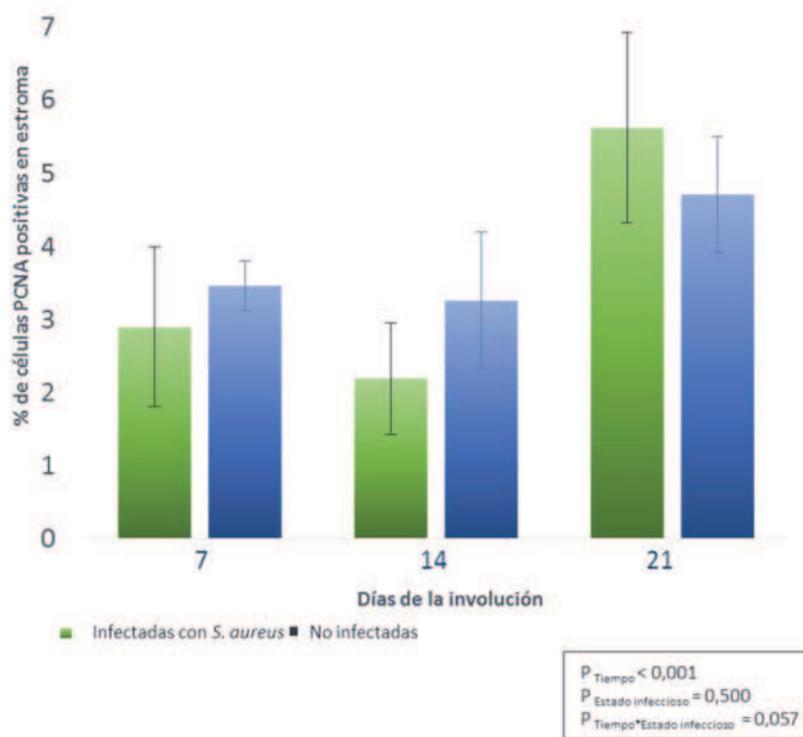


Figura 49: Porcentajes de proliferación evaluados a través de la expresión nuclear de PCNA en estroma de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de células PCNA positivas en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE).

5.7.2- Inmunomarcación para Ki-67

Este anticuerpo, al igual que PCNA, presentó un patrón de marcación nuclear. En el caso de Ki-67, todas las células positivas presentaron una tinción marrón intensa. Las mismas se presentaron también tanto en estroma como en parénquima, cuantificándose por separado para ambas zonas del tejido mamario. En la figura 50 se observa la marcación positiva para este anticuerpo.

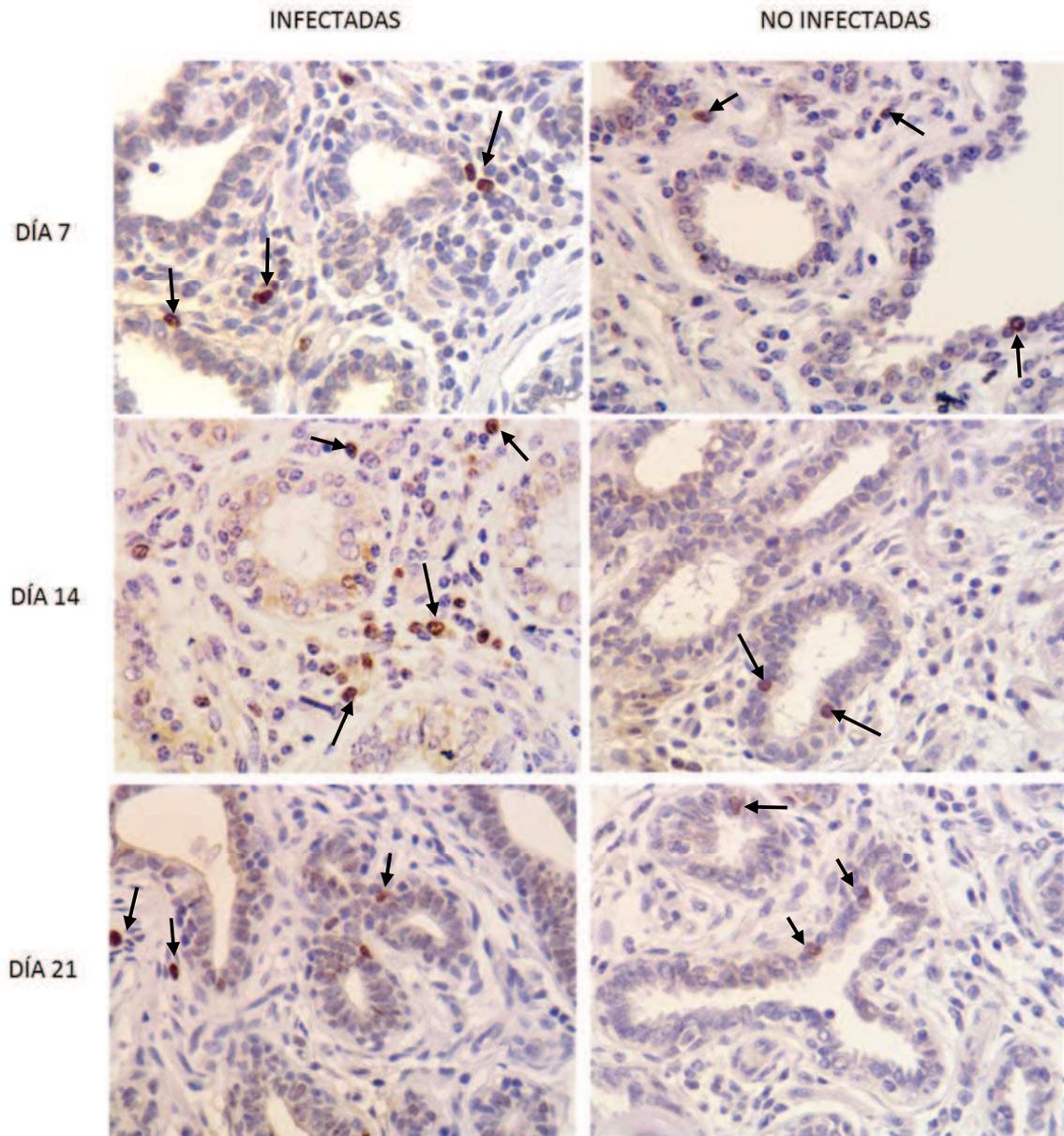


Figura 50: Inmunomarcación de células positivas para Ki-67 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas indican núcleos de células epiteliales y estromales intensamente marcadas. Aumento: 40 X.

En cuanto a la expresión nuclear de Ki-67, el análisis de los porcentajes de proliferación en el parénquima mamario, mostró un efecto significativo de la IIM ($p < 0,001$), pero no así del tiempo de muestreo ($p = 0,010$), no existiendo tampoco interacción significativa entre ambos factores ($p = 0,010$). En los cuartos infectados los porcentajes de proliferación fueron siempre mayores respecto de los sanos en todos los períodos evaluados, particularmente al día 14 de involución (Figura 51).

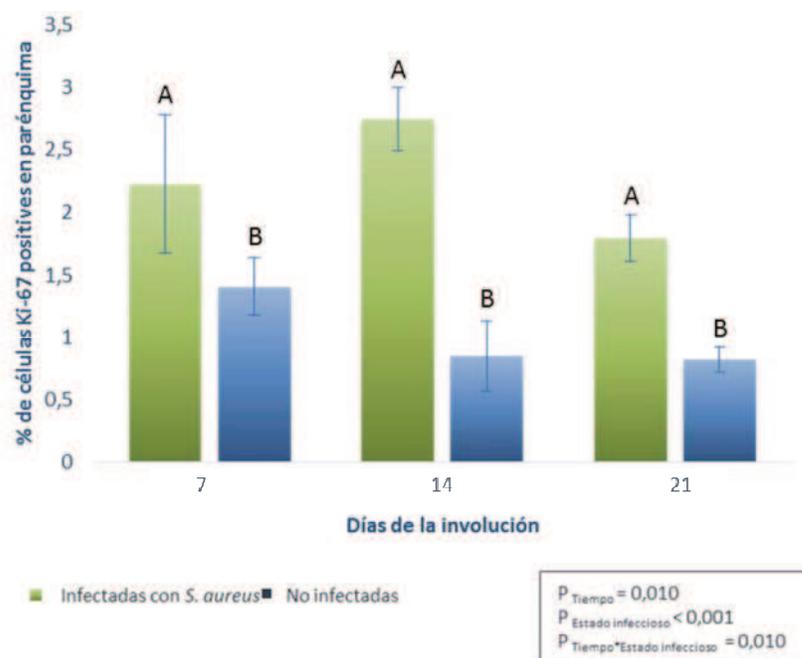


Figura 51: Porcentajes de proliferación evaluados a través de la expresión nuclear de Ki-67 en parénquima de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de células Ki-67 positivas en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

En el estroma mamario, los porcentajes de células Ki-67 positivas fueron mayores en los cuartos infectados respecto a los sanos en todos los periodos evaluados observándose un efecto significativo de la IIM ($p < 0,001$), no así del tiempo de muestreo ($p = 0,030$). Tampoco se observó interacción entre el estado de infección y el tiempo de muestreo ($p = 0,033$). En cuartos infectados, los mayores porcentajes de proliferación se observaron al día 7 de la involución (Figura 52).

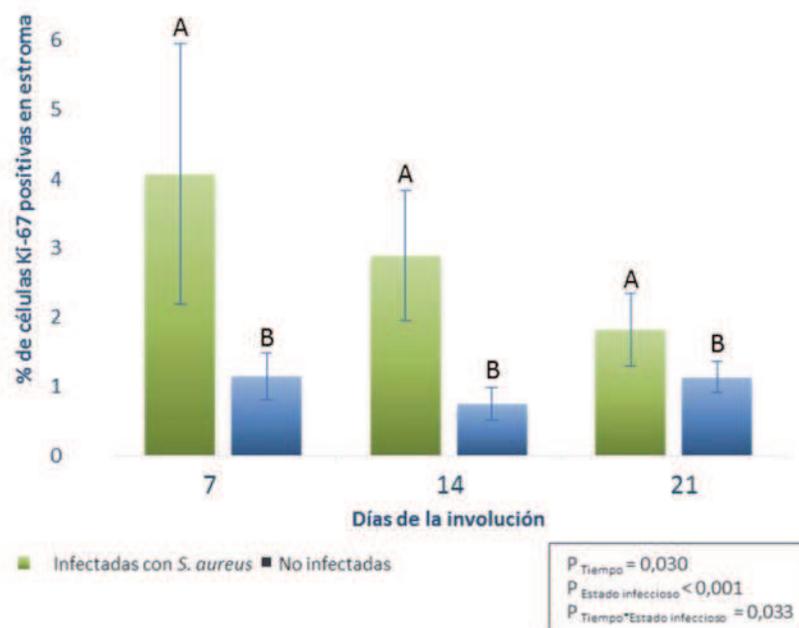


Figura 52: Porcentajes de proliferación evaluados a través de la expresión nuclear de Ki-67 en estroma de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de células Ki-67 positivas en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

5.8- Proteínas reguladoras de la apoptosis

Las proteínas Bcl-2, Bax, caspasa-3-activa y Fas, mostraron inmunomarcación positiva en todos los grupos experimentales evaluados, asociada a diferentes tipos celulares y localizaciones de acuerdo a cada proteína.

5.8.1- Bcl-2

La inmunomarcación para Bcl-2 se observó en todas las secciones de tejido, en intensidades diferentes, principalmente asociada a estructuras del parénquima. La reacción positiva se presentó en los núcleos, particularmente alrededor de la membrana nuclear interna y en el citoplasma de células epiteliales y estromales (Figura 53).

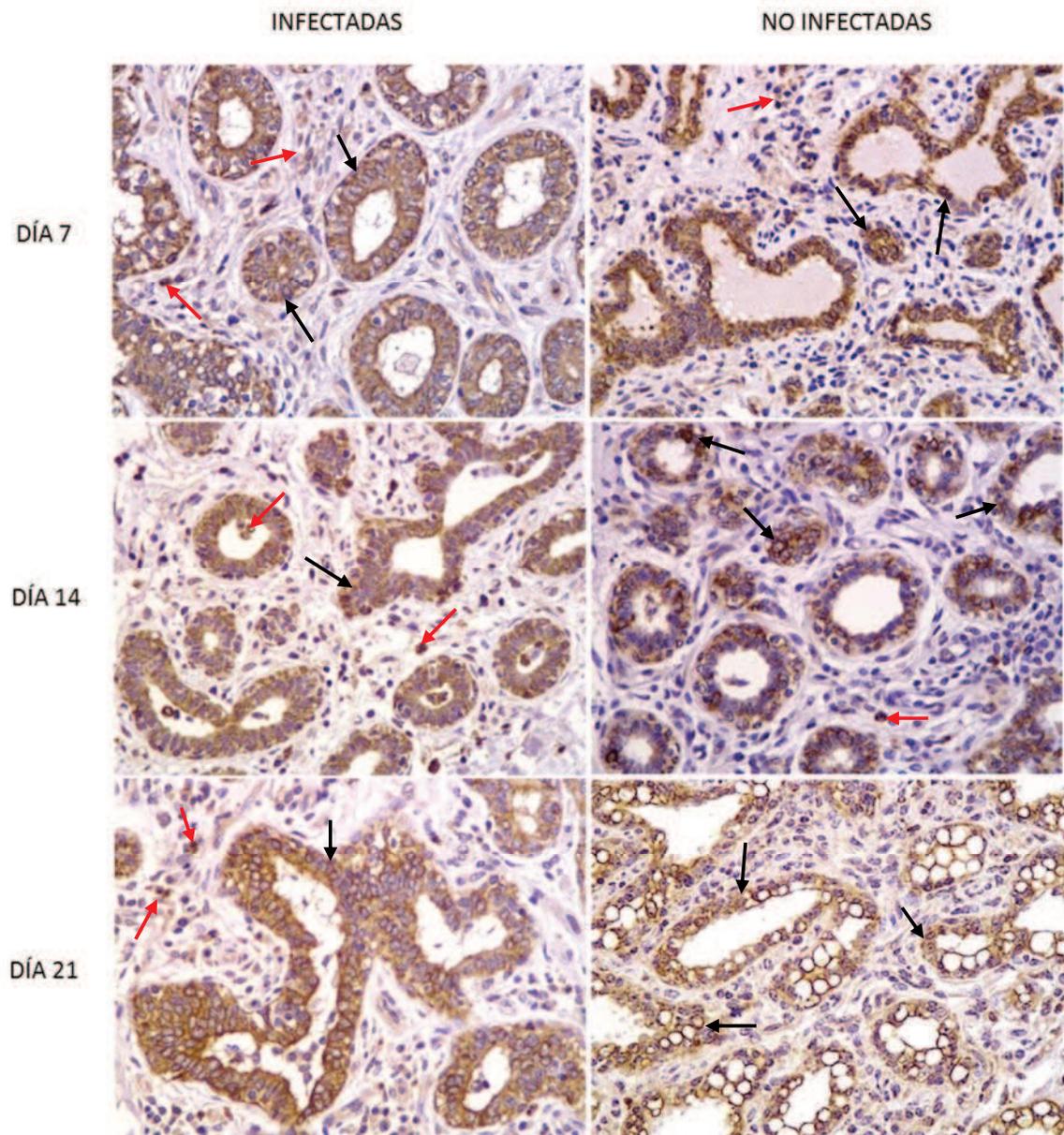


Figura 53: Inmunomarcación para Bcl-2 en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras indican células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas señalan células del estroma con marcación positiva. Aumento: 40 X.

Como se observa en la figura 54, los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 se vieron afectados por la IIM ($p < 0,001$) y por el tiempo de la involución ($p < 0,001$), observándose interacción entre ambos factores ($p = 0,01$). Los porcentajes de inmunomarcación para Bcl-2 fueron mayores en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). En cuartos infectados, los mayores porcentajes de expresión de Bcl-2 se observaron al día 21 de la involución.

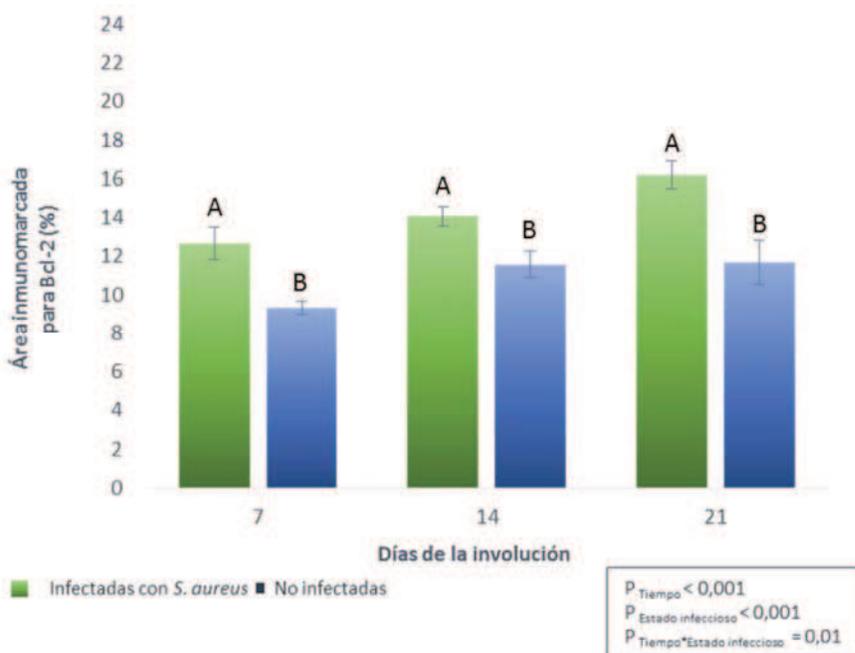


Figura 54: Porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

5.8.2- Bax

La expresión de Bax se asoció primariamente al epitelio de alvéolos y conductos del parénquima mamario. El patrón de localización de esta proteína fue similar al descrito para Bcl-2 (Figura 55).

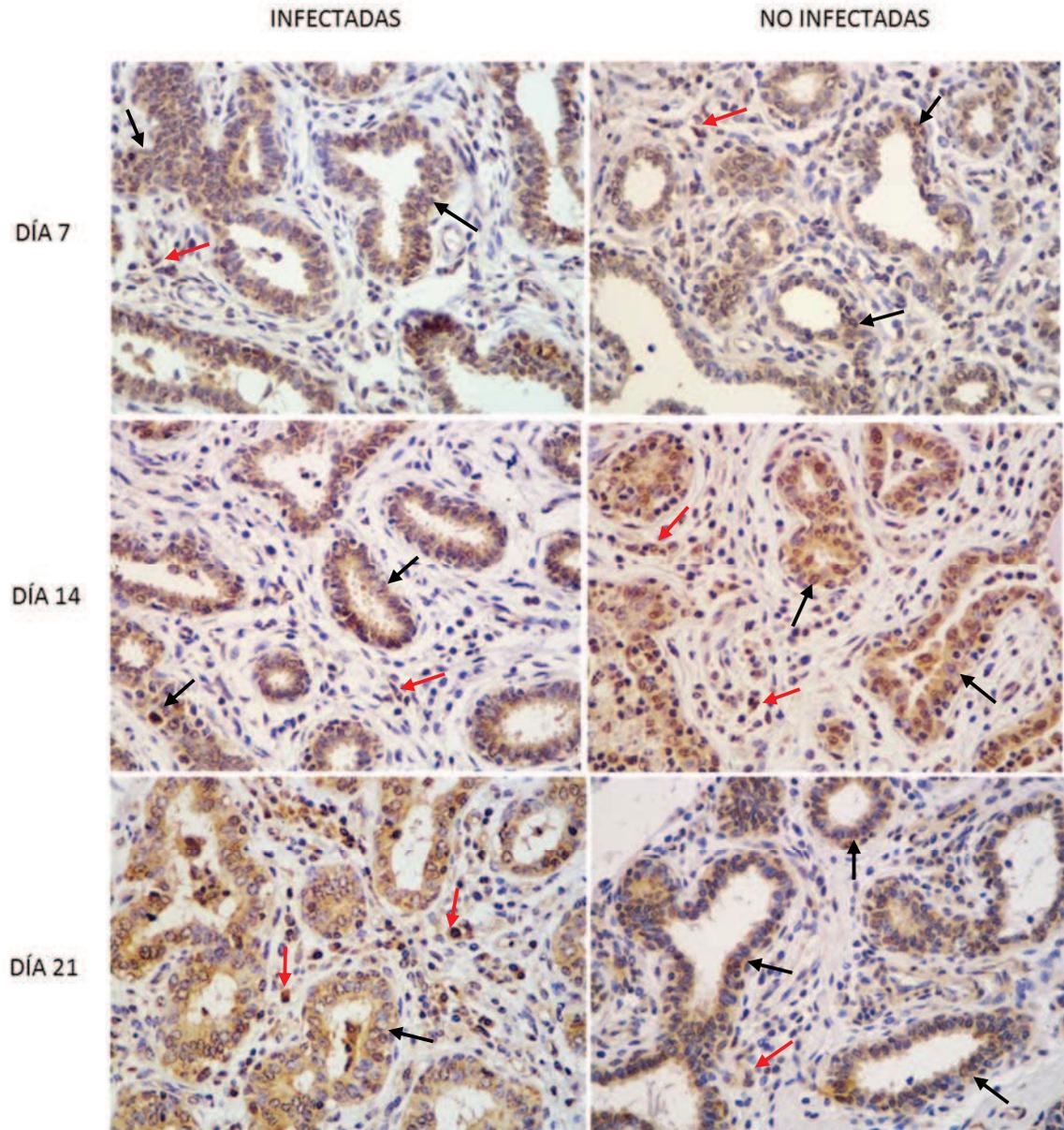


Figura 55: Inmunomarcación para Bax en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras indican células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas señalan células del estroma con marcación positiva.

En la figura 56 se observan los porcentajes de expresión de Bax en cada periodo de involución evaluado. La expresión de la proteína Bax se vio influenciada por la IIM ($p < 0,001$), observándose mayores porcentajes de inmunomarcación en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). No se observó efecto del tiempo de muestreo ($p = 0,231$) ni interacción entre este factor y el estado infeccioso ($p = 0,365$).

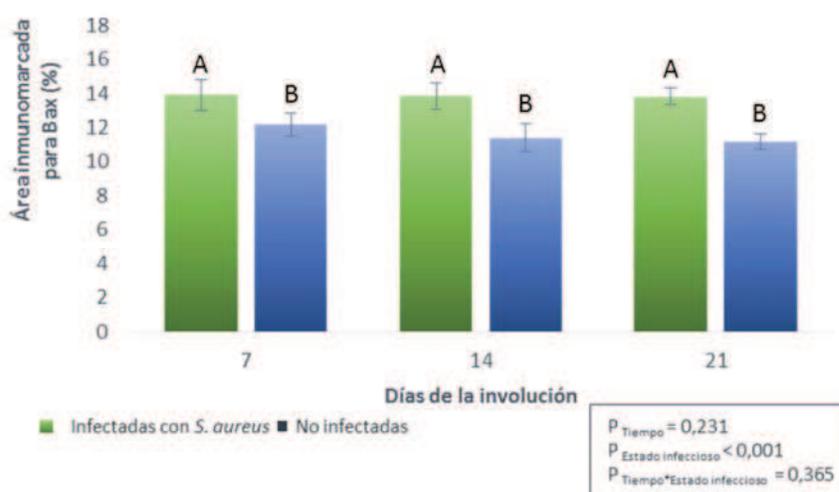


Figura 56: Porcentajes de área inmunomarcada para Bax en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

5.8.3- Fas

La expresión de Fas presentó un patrón de marcación similar a las anteriores proteínas, a nivel citoplasmático de células del parénquima y en menor medida del estroma (Figura 57).

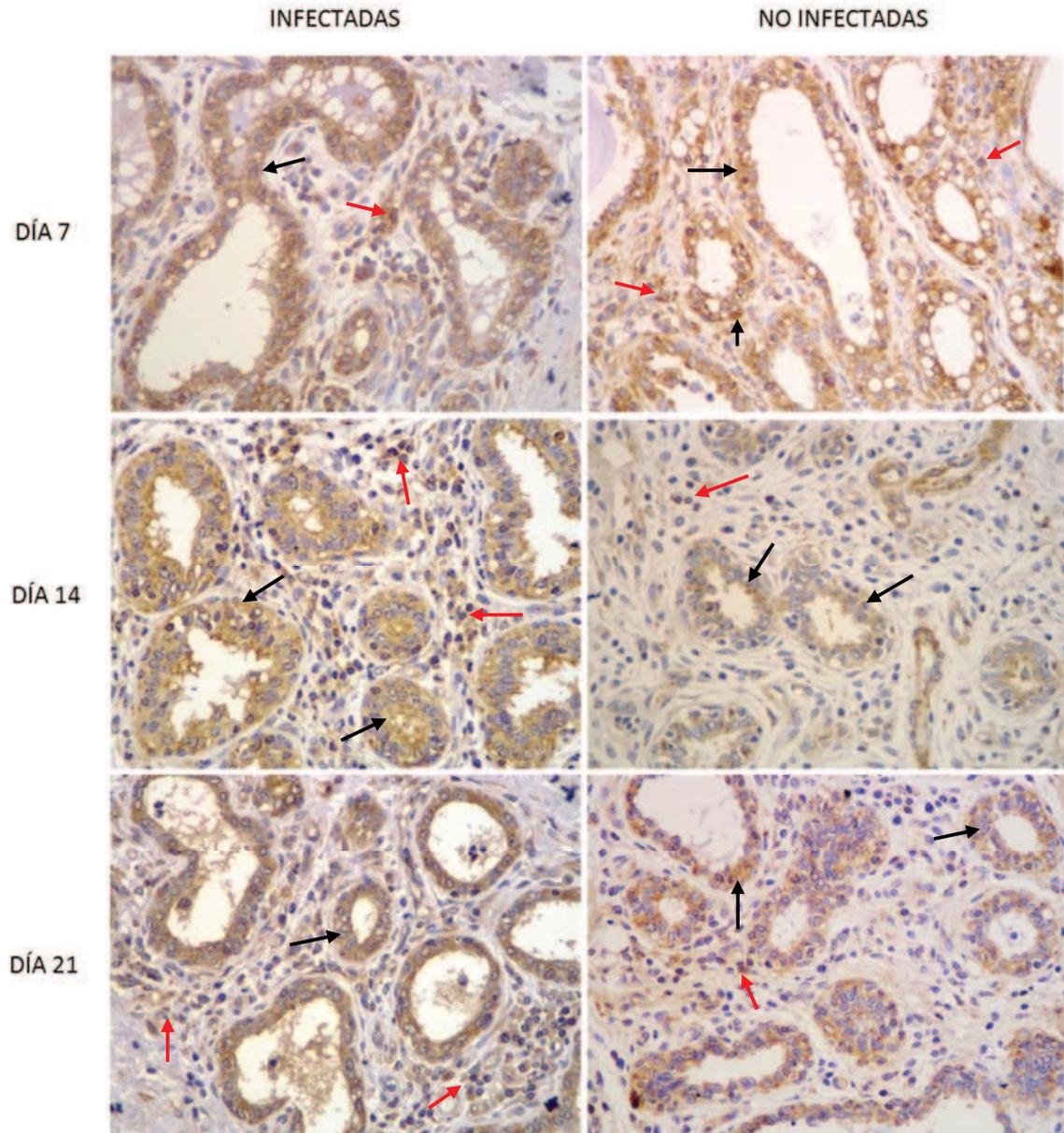


Figura 57: Inmunomarcación para Fas en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras indican células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas señalan células del estroma con marcación positiva. Aumento: 40 X.

Los porcentajes de área inmunomarcada, los cuales se representa en la figura 58, se vieron influenciados por la IIM ($p < 0,001$) y por el tiempo de la involución ($p < 0,001$), observándose interacción entre ambos factores ($p = 0,003$). Los porcentajes de inmunomarcación para Fas fueron mayores en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$).

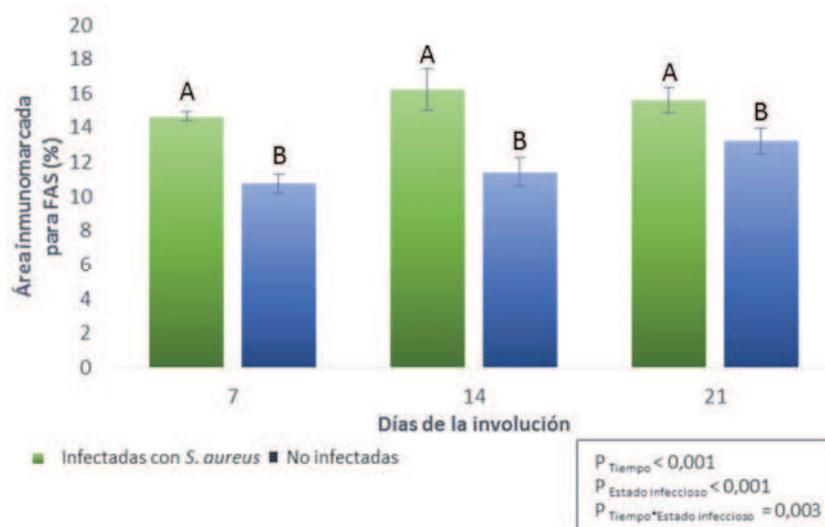


Figura 58: Porcentajes de área inmunomarcada para Fas en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

5.8.4- Caspasa-3-activa

Para caspasa-3-activa, se observó inmunomarcación positiva en células tanto del estroma como del parénquima mamario, a nivel nuclear y citoplasmático (Figura 59).

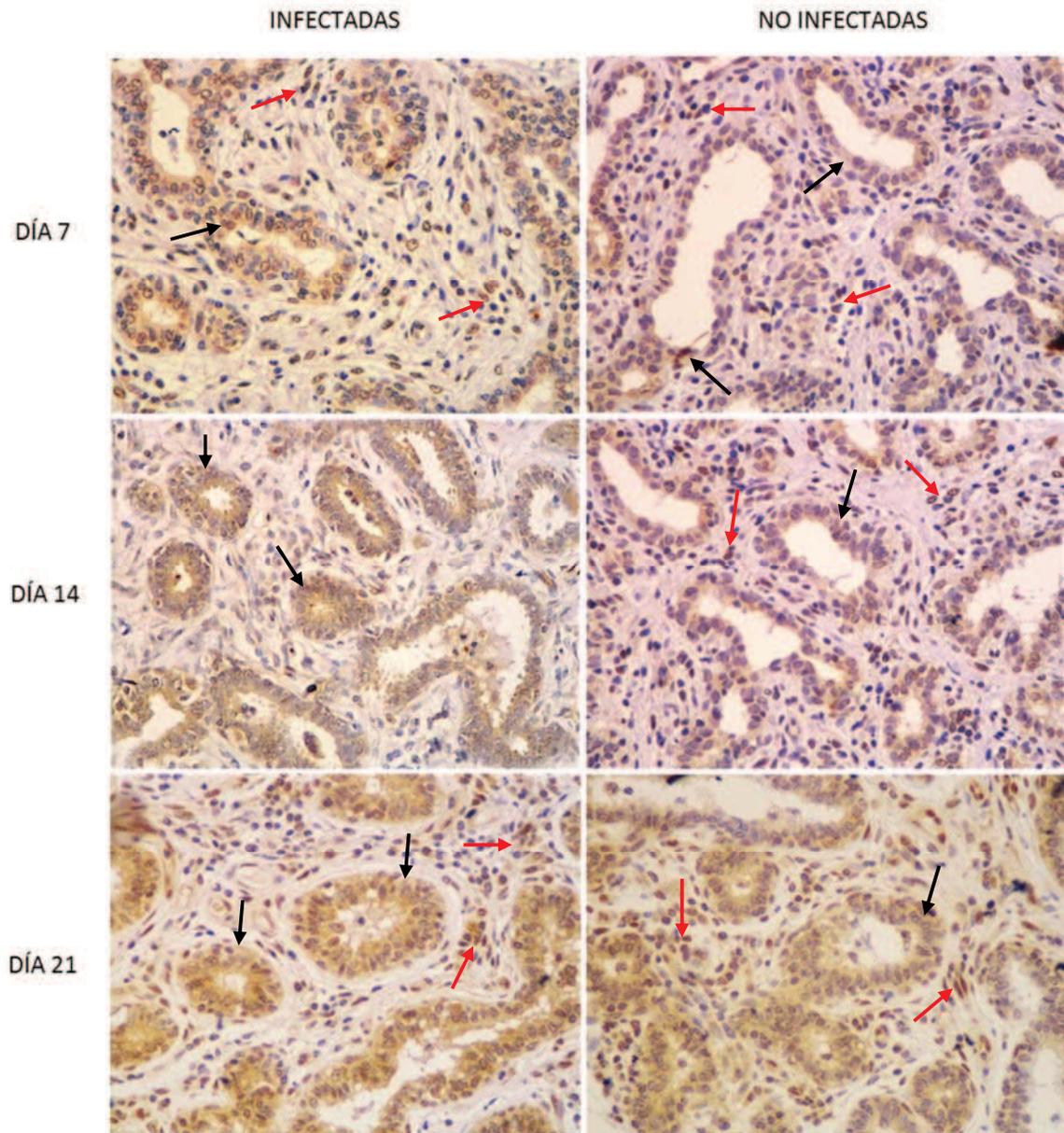


Figura 59: Inmunomarcación para caspasa-3 activa en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras indican células epiteliales alveolares intensamente marcadas. Las flechas rojas señalan células del estroma con marcación positiva. Aumento: 40 X.

En la figura 60 se representa el porcentaje de área inmunomarcada para esta proteína. Se evidenció un efecto significativo del estado infeccioso ($p < 0,001$), observándose mayores porcentajes de inmunomarcación en cuartos infectados

respecto a sanos en todos los periodos evaluados, no existiendo un efecto significativo del tiempo ($p=0,12$), ni tampoco interacción tiempo*estado ($p=0,281$).

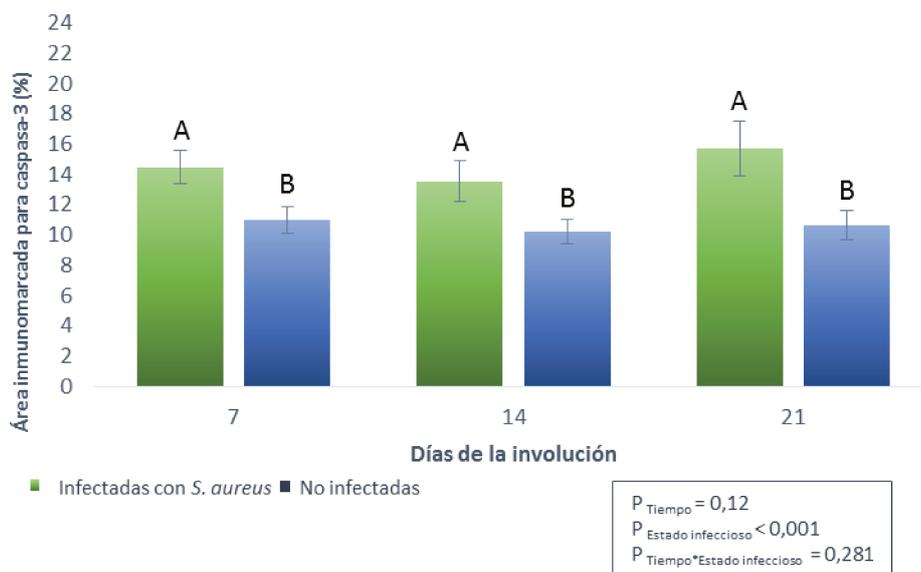


Figura 60: Porcentajes de área inmunomarcada para caspasa-3-activa en GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p<0,05$).

En la figura 61 se observan los resultados de los western blot realizados a fines de evaluar la especificidad de los anticuerpos utilizados en IHQ. En la figura A, correspondiente a Bcl-2, se puede observar una banda a la altura de los 25 kDa. En la figura B se observa una banda a la altura de los 21 kDa correspondiente a Bax. En C, correspondiente a Fas, se observa una banda a la altura de los 43 kDa. En D, correspondiente a Caspasa-3-activa, se observa una banda a los 17 kDa.

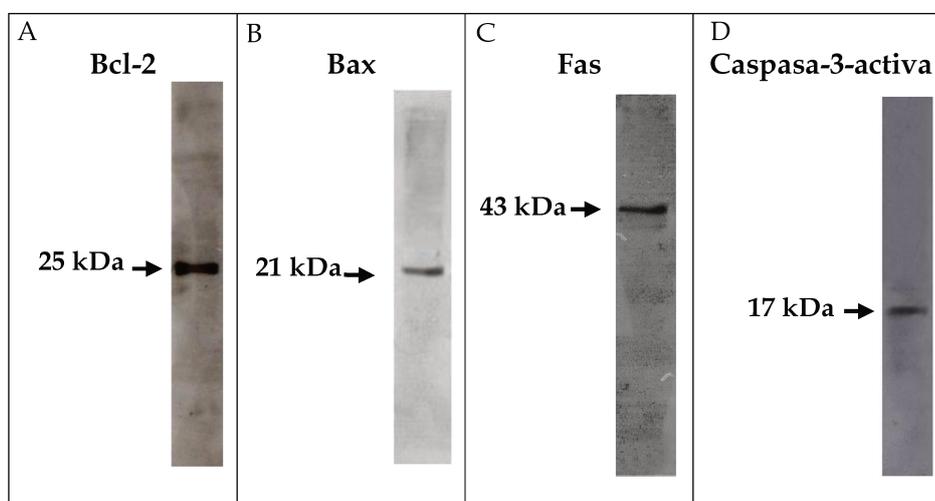


Figura 61: Western blot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ (anti- Bcl-2, Bax, Fas y Caspasa-3-activa) en tejido mamario.

5.9- TUNEL

La detección de células apoptóticas *in situ* se realizó mediante la técnica de TUNEL. Estas células, las cuales se observan en la figura 62, se pudieron identificar debido a su tinción y apariencia, ya que presentaron una coloración marrón en su núcleo debido al cromógeno utilizado, un citoplasma translúcido y en algunos casos apariencia fragmentada.

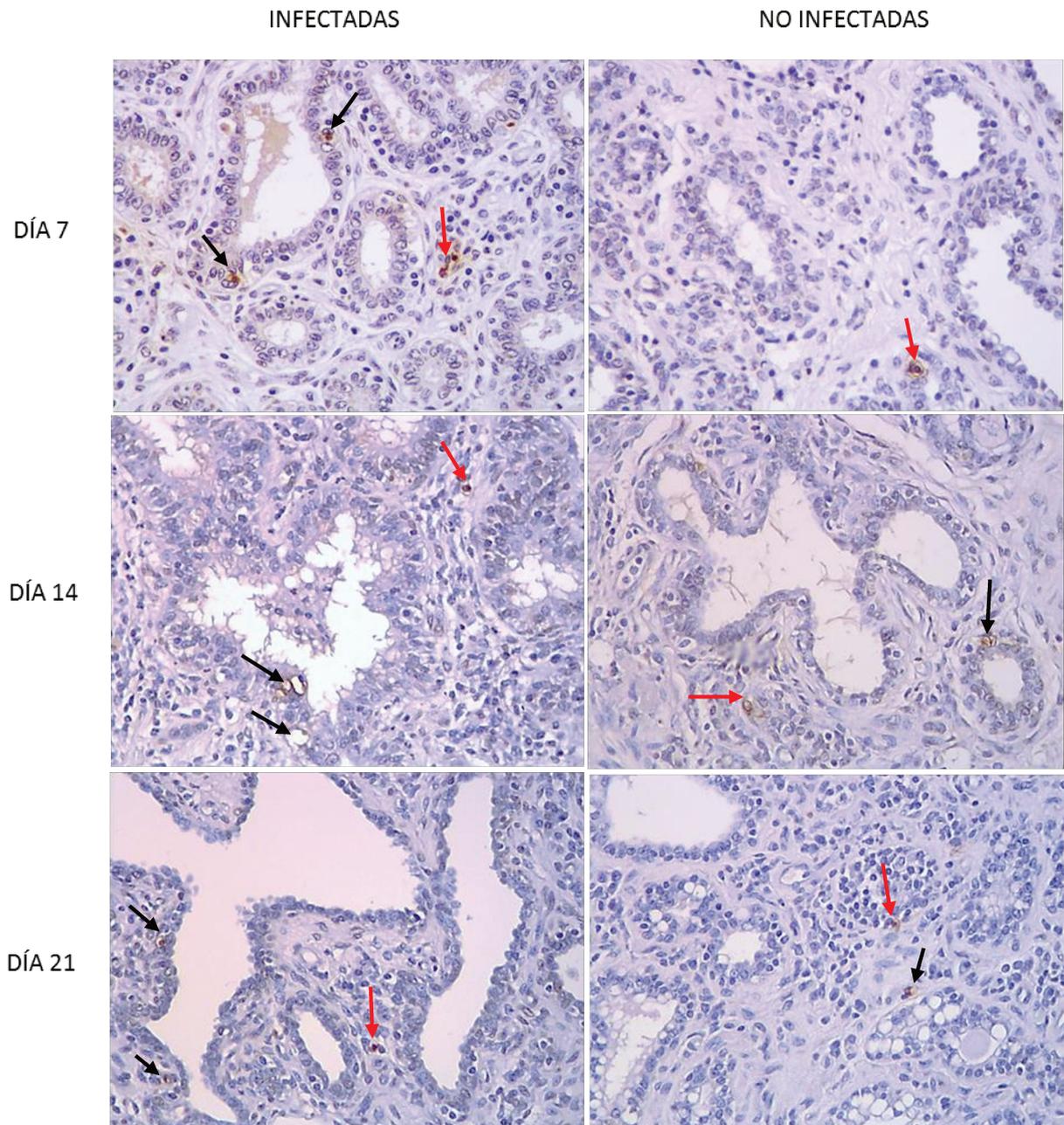


Figura 62: Inmunomarcación de células apoptóticas *in situ* mediante la técnica TUNEL en cuartos de GM infectadas crónicas por *S. aureus* y sanas, a los 7, 14 y 21 días de involución. Las flechas negras indican las células con marcación positiva en parénquima. Las flechas rojas indican las células positivas en estroma. Aumento: 40 X.

En cuanto a la zona del parénquima mamario, el análisis de los porcentajes de células reactivas a la técnica de TUNEL reveló un efecto de la IIM ($p=0,023$) y del tiempo de muestreo ($p<0,001$), no observándose interacción entre los factores ($p=0,221$). Por otra parte, se observaron mayores porcentajes de apoptosis en cuartos infectados respecto de sanos al día 21 de la involución ($p=0,006$), mientras que al día 7 ($p=0,123$) y 14 ($p=0,679$) no se observaron diferencias (Figura 63).

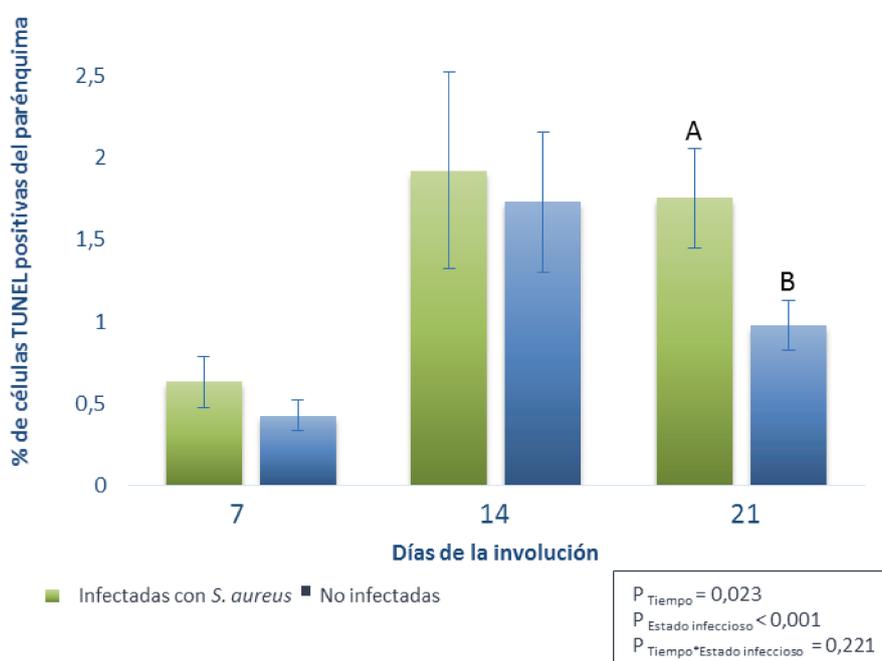


Figura 63: Porcentajes de apoptosis *in situ* evaluados a través de la reactividad de células a la técnica de TUNEL, en parénquima de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de células TUNEL positivas en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p<0,05$).

En el estroma mamario, se observó un efecto significativo de la IIM ($p<0,001$) y del tiempo ($p<0,001$), no observándose interacción entre los factores ($p=0,342$). Los porcentajes de células apoptóticas fueron mayores en los cuartos infectados respecto a los no infectados en los tres períodos evaluados ($p<0,05$) (Figura 64).

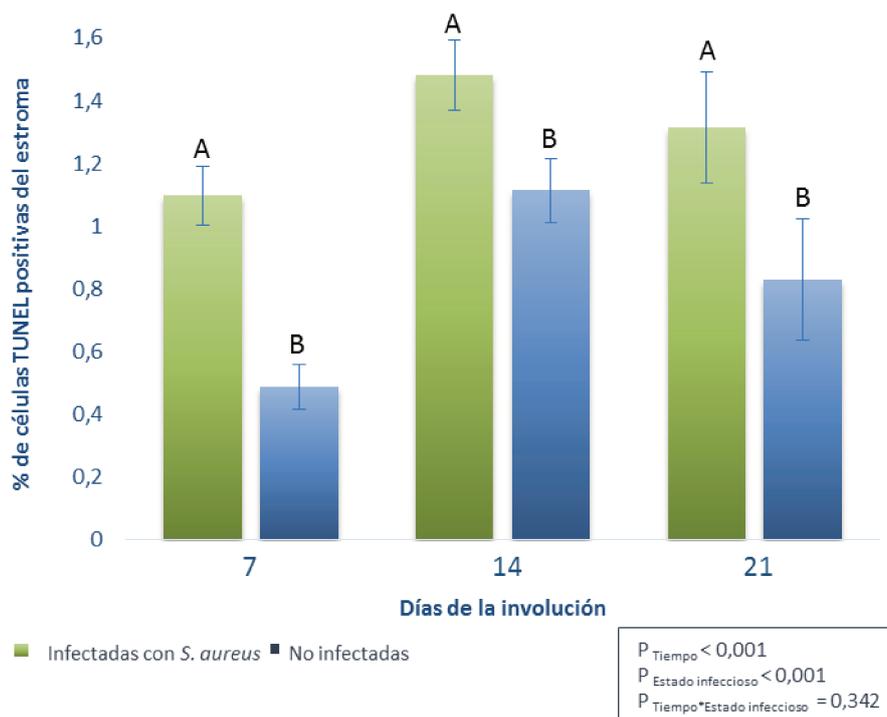


Figura 64: Porcentajes de apoptosis *in situ* evaluados a través de la reactividad de células a la técnica de TUNEL, en estroma de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de células TUNEL positivas en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

5.10- Relación proliferación / apoptosis (Ki-67 / TUNEL)

La relación entre los porcentajes de proliferación obtenidos mediante la marcación con Ki-67 y los de muerte celular a través de la técnica TUNEL, representa el balance entre ambos procesos en el tejido mamario. Esta relación se observa en las figuras 65 para parénquima y 66 para estroma.

En la zona del parénquima, el análisis de la relación Ki-67 / TUNEL mostró un efecto significativo del tiempo de muestreo ($p < 0,001$), no observándose efecto de la IIM ($p = 0,088$) ni de la interacción entre estos factores ($p = 0,50$). La relación Ki-67 / TUNEL fue mayor en cuartos infectados respecto a sanos al día 14 de la involución ($p = 0,001$), no observándose diferencias al día 7 ($p = 0,652$) y 21 ($p = 0,097$).

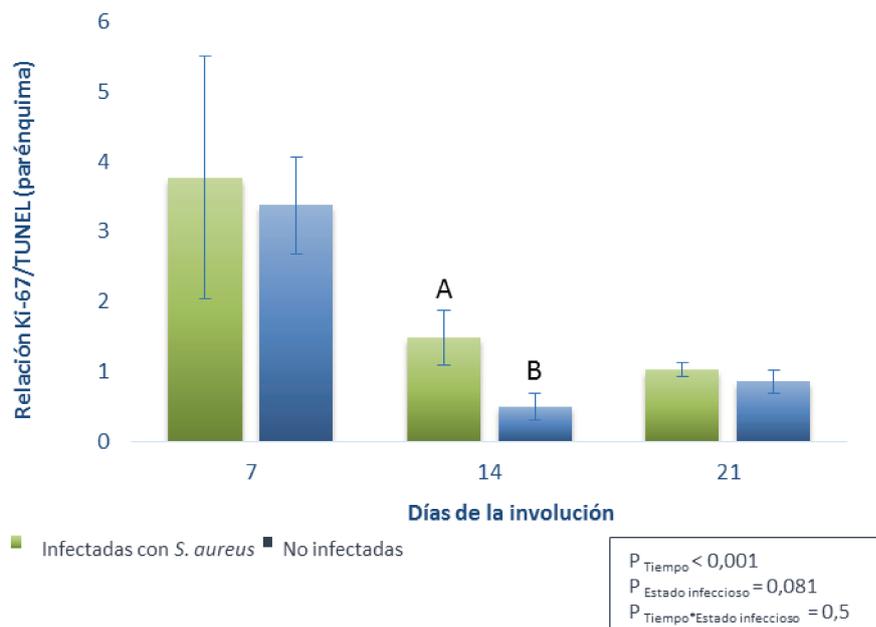


Figura 65: Relación proliferación/apoptosis mediante la razón Ki-67/TUNEL, en parénquima de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de la razón ki-67/TUNEL en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

Por otro lado, en la zona del estroma, se presentó la misma situación: un efecto significativo del tiempo de muestreo ($p < 0,001$), pero no de la IIM ($p = 0,012$) ni presencia de interacción entre los factores evaluados ($p = 0,223$). La relación Ki-67 / TUNEL fue mayor en cuartos infectados respecto a sanos al día 14 de la involución ($p = 0,003$), no observándose diferencias al día 7 ($p = 0,18$) y 21 ($p = 0,821$).

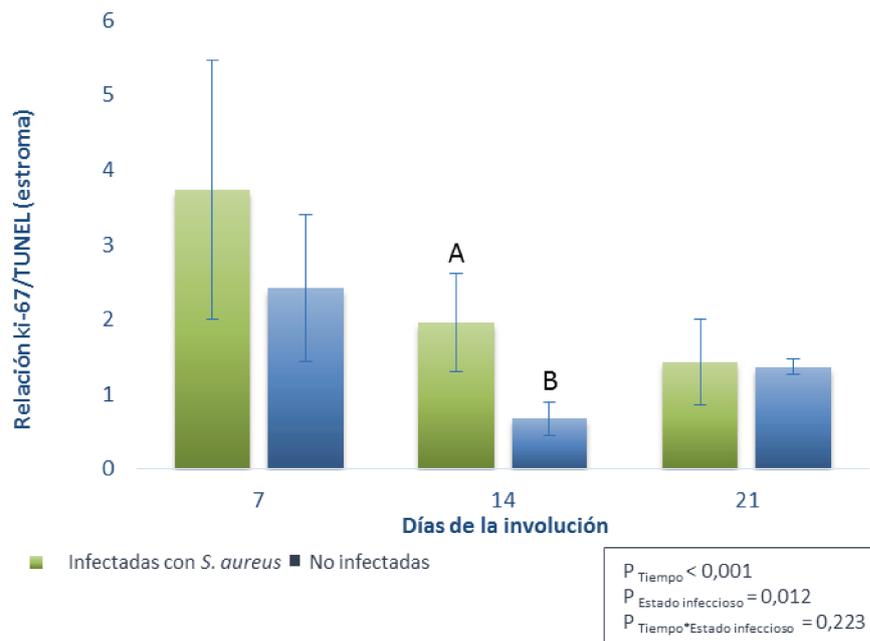


Figura 66: Relación proliferación/apoptosis mediante la razón Ki-67/TUNEL, en estroma de GM bovina sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de la razón Ki-67/TUNEL en los cuartos mamarios evaluados \pm el desvío estándar (DE). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado ($p < 0,05$).

Conclusiones parciales

En relación a los inhibidores intramamarios de la proliferación celular e inductores de la apoptosis y proteínas regulatorias intracelulares

- Los porcentajes de células PCNA positivas fueron mayores en parénquima de cuartos infectados crónicos en los tres tiempos evaluados con un máximo al día 21, existiendo un efecto significativo del estado infeccioso y del tiempo. Por otro lado, en el estroma no existió efecto significativo de ninguno de los dos factores evaluados.

- Los porcentajes de células del estroma y parénquima mamario Ki-67 positivas fueron mayores en cuartos infectados crónicos con respecto a no infectados en todos los periodos de la involución evaluados, con un efecto significativo del estado infeccioso, pero no del tiempo de muestreo. En cuartos infectados crónicos, los mayores porcentajes de proliferación en células del parénquima se observaron al día 14, mientras que en células del estroma los mayores porcentajes se registraron al día 7, disminuyendo gradualmente hacia el final de la involución.

- Los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 y Fas, fueron mayores en cuartos infectados crónicos con respecto a no infectados, observándose un efecto significativo del tiempo y del estado infeccioso así como también interacción entre ambos factores. En cuartos infectados, la inmunoexpresión de Bcl-2, aumentó gradualmente con el progreso de la involución.

- En cuanto a los porcentajes de inmunomarcación para Bax y Caspasa-3 activa, existió sólo un efecto significativo de la infección, observándose una mayor expresión en cuartos infectados crónicos respecto a no infectados en todos los periodos de la involución evaluados.

- Los porcentajes de apoptosis *in situ* obtenidos mediante la técnica TUNEL, fueron mayores en GM infectadas crónicamente con *S. aureus* respecto a no infectadas, tanto en parénquima como en estroma, observándose un efecto significativo del tiempo y del estado infeccioso.

- En células del parénquima, sólo se observó un incremento significativo en los porcentajes de apoptosis en cuartos infectados respecto a no infectados al día 21 de la involución, mientras que en células del estroma los porcentajes de apoptosis fueron mayores en infectados respecto a no infectados en todos los periodos evaluados.

- Respecto a la relación proliferación/apoptosis (Ki-67 / TUNEL), tanto en parénquima como en estroma, se presentó la misma situación: un efecto significativo del tiempo de muestreo pero no de la IIM ni presencia de interacción entre los factores evaluados. En células del parénquima y del estroma mamario, la relación Ki-67/TUNEL fue mayor en cuartos infectados respecto a sanos sólo al día 14 de la involución.

Objetivo específico Nro. 5: "Investigar in vitro los cambios en la capacidad fagocítica de macrófagos colectados a partir de secreciones mamarias provenientes de cuartos sanos y de cuartos con infecciones crónicas por S. aureus en diferentes estadios de la involución".

5.11- Evaluación de la capacidad fagocítica de macrófagos

Se evaluó *in vitro* la capacidad fagocítica de macrófagos purificados a partir de secreciones mamarias provenientes de cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución. Se enfrentó a la población de macrófagos con una suspensión de *S. aureus* marcada con FITC, se tiñó con bromuro de etidio y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de macrófagos capaces de fagocitar al menos una bacteria.

Sobre la base de los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad citoplasmática (SSC) se seleccionó la población R1 que contiene a los macrófagos (Figura 67A) y se analizó el porcentaje de estas células positivas para FITC, es decir que poseen al menos una bacteria en su interior. En figura 67B se muestran histogramas representativos del porcentaje de macrófagos FITC positivos correspondientes a los cuartos de los dos grupos de animales (infectados y no infectados) y a los tres períodos de la involución evaluados.

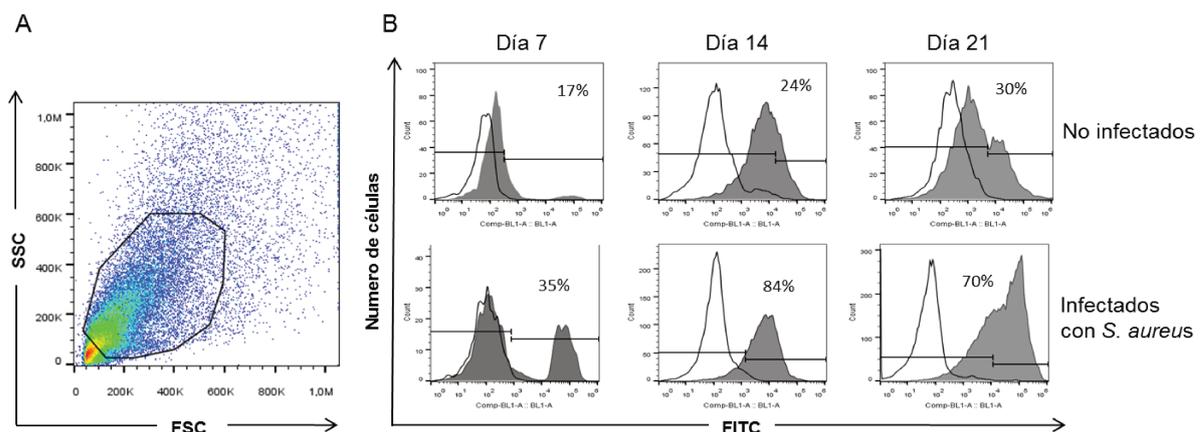


Figura 67: Fagocitosis por macrófagos obtenidos de secreciones mamarias de cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución. A) Población de macrófagos seleccionada sobre la base de los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad citoplasmática (SSC). B) Histogramas representativos mostrando la intensidad de fluorescencia para macrófagos provenientes de cuartos infectados con *S. aureus* y no infectados en los tres periodos de la involución evaluados.

En la figura 68 se muestran los porcentajes promedios de macrófagos positivos para FITC en secreciones mamarias provenientes de cuartos infectados por *S. aureus* y no infectados durante la involución. El análisis estadístico de los datos arrojó un efecto significativo de la infección por *S. aureus* sobre los porcentajes de macrófagos en secreciones mamarias capaces de fagocitar al menos una bacteria durante la involución ($p=0,027$). Al día 7, no se observaron diferencias en los porcentajes de macrófagos positivos provenientes de cuartos infectados con respecto a no infectados ($p=0,093$), sin embargo, al día 14 y 21, los porcentajes de macrófagos con capacidad fagocítica fueron mayores en secreciones de cuartos infectados con respecto a sanos ($p=0,001$ y $p<0,001$, respectivamente).

En secreciones provenientes de cuartos infectados, los porcentajes de macrófagos positivos fueron en ascenso con el progreso de la involución, observándose al día 14 y 21 porcentajes similares y significativamente superiores a los observados al día 7 ($p<0,05$). En las secreciones de cuartos no infectados, si bien los porcentajes de macrófagos positivos fueron en ascenso con el progreso de la involución, no se observaron diferencias estadísticas entre los tres periodos evaluados ($p=0,128$).

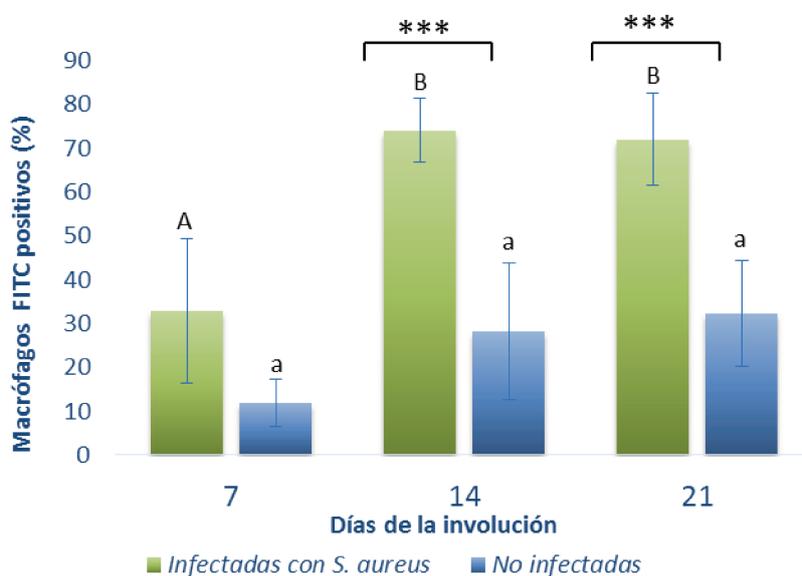


Figura 68: Porcentajes promedios de macrófagos positivos para FITC en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados por *S. aureus* y no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución \pm el desvío estándar (DE). Los asteriscos denotan diferencias significativas para cada periodo de tiempo (***) = $p<0,001$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada grupo experimental ($p<0,05$).

Un dato interesante a destacar es que, además del aumento en la frecuencia de macrófagos con capacidad fagocítica, se observó un aumento significativo en el número de bacterias fagocitadas por célula en las secreciones provenientes de los cuartos infectados en comparación con los no infectados durante la involución, evaluado por el parámetro de Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) ($p < 0,001$) (Figura 69). A los 7 y 14 días de la involución, la IFM fue mayor en secreciones mamarias provenientes de cuartos infectados con respecto a no infectados ($p = 0,001$; $p = 0,007$, respectivamente), no así al día 21 donde los valores de IFM fueron similares ($p = 0,093$). En secreciones provenientes de cuartos infectados, si bien el número de bacterias fagocitadas fue mayor al día 14, no se observaron diferencias con respecto al día 7 y 21 de la involución ($p = 0,97$). En secreciones provenientes de cuartos no infectados, el número de bacterias fagocitadas fue en aumento con el progreso de la involución, registrándose mayores IFM al día 14 y 21 de la involución en comparación con el día 7 ($p < 0,05$).

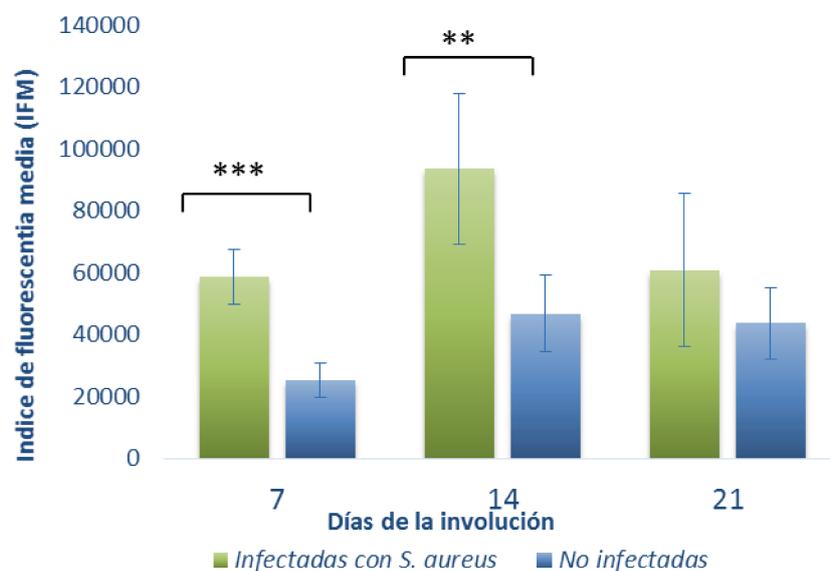


Figura 69: Promedios de las intensidades de fluorescencia media (IFM) en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados por *S. aureus* y no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución \pm el desvío estándar (DE). Los asteriscos notan diferencias significativas para cada periodo de tiempo (***) = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para cada grupo experimental ($p < 0,05$).

Conclusiones parciales

En relación a la actividad fagocítica de macrófagos de secreción mamaria:

- Se observó un efecto significativo de la infección por *S. aureus* y sobre los porcentajes de macrófagos capaces de fagocitar al menos una bacteria durante la involución.

- Al día 7 no se observaron diferencias en los porcentajes de macrófagos positivos entre secreciones de cuartos infectados y cuartos no infectados, sin embargo al día 14 y 21 los porcentajes de macrófagos positivos fueron mayores en cuartos infectados respecto a no infectados.

- En las secreciones de cuartos infectados, los porcentajes de macrófagos positivos se incrementaron con el progreso de la involución, observándose al día 14 y 21 porcentajes similares y significativamente superiores a los observados al día 7.

- En las secreciones de cuartos no infectados, los porcentajes de macrófagos positivos se incrementaron con el progreso de la involución, pero sin diferencias significativas entre los tres periodos evaluados.

- Se observó un efecto significativo de la infección por *S. aureus* sobre el número de bacterias fagocitadas por célula durante la involución.

- Al día 7 y 14 el número de bacterias fagocitadas por célula fue mayor en las secreciones provenientes de cuartos infectados en comparación con los no infectados, mientras que al día 21 se observaron valores similares entre ambos grupos.

- En secreciones de cuartos infectados, el número de bacterias fagocitadas fue mayor al día 14, pero no se observaron diferencias con respecto al día 7 y 21 de la involución.

- En secreciones de cuartos no infectados, el número de bacterias fagocitadas fue en aumento con el progreso de la involución, registrándose mayores porcentajes de macrófagos positivos al día 14 y 21 en comparación con el día 7 de la involución.

6- Discusión

Objetivo específico Nro. 1: Caracterizar la respuesta inmune innata y adaptativa en tejido mamario sano y con infecciones naturales crónicas por S. aureus durante la involución activa.

Objetivo específico Nro. 2: Caracterizar el nivel de citoquinas en secreciones mamarias de cuartos sanos y con infecciones crónicas por S. aureus durante la involución activa.

6.1- Respuesta inmune innata

6.1.1- Receptores tipo toll (TLR-2 y TLR-4)

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra los patógenos. Consta de un conjunto de mecanismos celulares y bioquímicos que existen antes incluso de la infección y que pueden responder con rapidez a ella. Actúa contra los agentes extraños mediante el reconocimiento de estructuras conservadas evolutivamente en ellos. Las bacterias presentan diferentes estructuras en la pared celular que son reconocidas por receptores específicos de la membrana plasmática (Takeda y Akira, 2005). El reconocimiento y activación de estos receptores es esencial para la iniciación de una respuesta inmune innata efectiva contra los patógenos.

Se ha demostrado que los receptores TLR-2 y TLR-4 son sensibles a ligandos microbianos y es conocido que TLR-2 es activado por peptidoglucanos (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA), que son componentes de la pared celular de bacterias Gram positivas, mientras que microorganismos Gram negativos son reconocidos por TLR-4, donde LPS actúa como ligando (Takeda y Akira, 2005).

Los TLR-2 y TLR-4 pueden ser expresados por monocitos y por una gran variedad de células como neutrófilos, células dendríticas, linfocitos B, fibroblastos, astrocitos, queratinocitos, miocitos, células endoteliales y células epiteliales (Frantz y col., 1999; Hornung y col., 2002; Song y col., 2002; Petzl y col., 2008). En el presente trabajo la expresión de TLR-2 y TLR-4 se asoció con la superficie apical de las células epiteliales que revisten los alvéolos y conductos mamarios tanto en cuartos sanos como infectados con *S. aureus*. Además, células del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos reaccionaron intensamente a la inmunomarcación con los anticuerpos utilizados. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos recientemente por Baravalle y col. (2015), donde utilizando los mismos anticuerpos primarios, detectaron ambos

receptores con similar localización celular y especificidad en tejido mamario de bovinos con ubres clínicamente sanas a los 7 días de la involución.

Estudios previos han demostrado la expresión de ARNm para TLR-2, TLR-4 y TLR-9 en tejido mamario bovino. Entre estos receptores, la expresión de TLR-2 y TLR-4 fue sustancialmente mayor en los cuartos mamarios que presentaban IIM subclínicas, moderadas o severas; y dicha expresión, a su vez, se correlacionó con la severidad de la infección (Goldammer y col., 2004). La expresión génica de TLR-2 y TLR-4 también ha sido reportada en CEM, monocitos-macrófagos y neutrófilos (Wright y col., 1990; Strandberg y col., 2005, Fu y col., 2013; Gilbert col., 2013); sin embargo, la expresión proteica de estos receptores en GM infectadas con *S. aureus* no ha sido documentada hasta el momento.

Si bien la participación de TLR-2 ha sido implicada en la respuesta inmune del hospedador en varios modelos de infección estafilocócica, (Takeuchi y col., 2000; Hoebe y col., 2005) y la de TLR-4 en infecciones por bacterias Gram negativas como *E. coli* (Fu y col., 2013), nuestros resultados mostraron un efecto significativo de la IIM por *S. aureus* sobre los porcentajes de expresión proteica de ambos receptores de la inmunidad innata, observándose mayores porcentajes de marcación en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* en relación a los no infectados durante todos los periodos evaluados, alcanzando la máxima expresión al día 7 de la involución. En estudios previos Goldammer y col. (2004) observaron aumentos significativos en la expresión génica para TLR-2 y TLR-4 en tejido mamario proveniente de cuartos mamarios con IIM clínicas por *S. aureus* y *E. coli*, indicando la participación de ambos receptores en el reconocimiento de estos patógenos. Asimismo, Yang y col. (2008) en cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas, observaron que infecciones con *S. aureus* y *E. coli* inactivadas con calor inducían un aumento de similar intensidad en la expresión génica de TLR-2 y TLR-4. En el presente estudio, si bien no se evaluó la expresión génica de estos receptores, se observó un aumento en la expresión proteica de los mismos en cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* en comparación con cuartos sanos. Si bien estos resultados no son suficientes para indicar una mejora en la percepción del patógeno y en la respuesta inmune inducida, sí se puede afirmar que en cuartos infectados crónicos ambos receptores son

significativamente expresados por las células epiteliales y células inmunes presentes en la GM y participan en el reconocimiento de *S. aureus* respecto de glándulas no infectadas y que la abundancia relativa de los mismos en el tejido infectado es mayor en las fases iniciales de la involución cuando la remodelación de la GM es intensa.

Aspectos recientes de la biología de los TLRs han mostrado que aunque los mismos son cruciales para una respuesta inmune eficiente, ciertos patógenos utilizan estrategias basadas en los TLRs para evadir las defensas del hospedador. Estudios *in vitro* demostraron que *S. aureus* induce una activación deficiente de las señales mediadas por TLR-2 prolongando la vida de la bacteria en los macrófagos (Watanabe y col., 2007), lo que podría favorecer el desarrollo de infecciones crónicas. Si bien en el presente estudio no se evaluó la activación de los receptores, el hecho de que en cuartos infectados los mayores porcentajes de inmunomarcación para TLR-2 se detectaron al día 7 de la involución disminuyendo en forma gradual a lo largo del periodo de muestreo, podría indicar una reducción gradual de la estimulación de la inmunidad innata que podría facilitar la permanencia de la bacteria a la GM bovina durante el período de involución mamaria.

La mayoría de los conocimientos actuales sobre la implicancia de los TLRs en las infecciones por bacterias Gram positivas se basan en estudios realizados *in vitro* en células epiteliales mamarias de origen humano o de ratón y en estudios *in vivo* en ratones por el fácil acceso a la tecnología "knockout" (Dallard y Calvino, 2010). La importancia de los resultados obtenidos en este trabajo radica en que, la mayoría de los estudios sobre patógenos causantes de mastitis se han realizado *in vitro*, utilizando líneas de células epiteliales mamarias resultando escasos los trabajos *in vivo* con animales que hayan adquirido la infección naturalmente.

6.1.2- Monocitos macrófagos

La actividad de las células inmunes durante los estadios tempranos de la patogenia tiene un rol central en el establecimiento de la IIM, cumpliendo un papel principal los macrófagos como primera señal de alarma frente a la exposición a productos bacterianos (Rainard y Riollot, 2006). Cuando los macrófagos reconocen bacterias, disparan la liberación de prostaglandinas y leucotrienos que aumentan el

proceso inflamatorio local y estimulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 β y TNF- α , que favorecen la actividad bactericida de los neutrófilos (Bannerman y col., 2004).

El receptor 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; Sohn y col., 2004). 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). 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). En el presente estudio, con el anticuerpo primario utilizado (anti CD14) sólo se detectaron monocitos-macrófagos inmunorreactivos, no observándose reacción positiva en los neutrófilos. En relación a la localización de las células inmunorreactivas en el tejido mamario, se identificaron en el estroma rodeando las células epiteliales alveolares y en la luz de conductos y alvéolos, de manera similar a lo observado por Dallard y col. (2009) en un trabajo en el cual identificaron y cuantificaron monocitos-macrófagos por IHQ en GM bovinas crónicamente infectadas por *S. aureus* durante la involución activa.

Los estudios mencionados de Dallard y col. (2009), revelaron que en cuartos mamarios crónicamente infectados por *S. aureus* el número de monocitos-macrófagos fue significativamente mayor al hallado en cuartos sanos durante las tres primeras semanas posteriores al secado. En el presente estudio, el número de monocitos-macrófagos inmunomarcados con anti CD14 fue mayor en cuartos infectados con respecto a no infectados y se vio influenciado tanto por el tiempo de muestreo como por el proceso infeccioso. En concordancia con los hallazgos de Dallard y col. (2009), en cuartos infectados el mayor número de fagocitos se registró al día 7, para disminuir gradualmente hacia el día 21 de la involución. Por otra parte, Leitner y col. (2003) estudiaron la distribución de células inmunes en tejido mamario infectado crónicamente con *S. aureus* y en tejido mamario sano, mostrando un número elevado de macrófagos en la mayoría de los cuartos infectados, localizados en el tejido conectivo interalveolar y

dentro del lumen alveolar coincidiendo con lo observado en el presente estudio. Estos resultados, sumados a los obtenidos por otros autores (Sladek y Rysanek, 2006), sugieren un rol central de estas células en las mastitis crónicas por *S. aureus* durante el proceso de remodelación mamaria, asociado a un intento de controlar el proceso infeccioso y reparar el daño ocasionado en el tejido mamario.

El mayor número de monocitos-macrófagos observados en cuartos infectados respecto a sanos durante la primera semana de la involución y la posterior disminución hacia el día 21 sugieren un menor flujo de fagocitos a la GM infectada. Estos resultados se relacionan con lo observado para los receptores TLR-2 y TLR-4 en cuartos infectados, los cuales mostraron el mismo comportamiento en su expresión. En vacas crónicamente infectadas, se ha demostrado la presencia de *S. aureus* viables en el interior de macrófagos y en células alveolares aisladas de leche (Hebert et al., 2000), lo cual favorecería la evasión de las defensas del hospedador por parte de la bacteria evitando ser reconocida por los receptores tipo *toll* con la consecuente persistencia en la GM. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente estudio, la disminución en el número de monocitos-macrófagos observada en cuartos infectados con el progreso de la involución, podría relacionarse con la persistencia intracelular de la bacteria, que al no ser reconocida por sistema inmune conduciría a una menor estimulación de la respuesta inmune innata y consecuentemente a menor atracción de células inflamatorias a la GM.

6.1.3- Cuantificación de citoquinas en tejido mamario y en secreción mamaria

TNF- α es una citoquina secretada principalmente por células del sistema inmune, tales como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T, principalmente CD4+. De la misma manera, otras células pueden producirlo como respuesta a un estímulo, tales como astrocitos, microgliocitos, miocitos y fibroblastos. Las CEM de la GM bovina en respuesta a un estímulo bacteriano también son capaces de sintetizar y secretar TNF- α (Brenaut y col., 2014). Su efecto pleiotrópico tiene como resultado la síntesis de citoquinas entre las que se encuentran la IL-1, IL-4, y la IL-6, también TGF- β , proteínas de fase aguda y hormonas. Muchos de los mediadores

inducidos por el TNF- α actúan a su vez como inhibidores de su expresión, tales como la IL-6, entre otros (Ibelgaufts, 1995; Dinarello y Moldawer, 1999; Anaya, 2003). En el presente estudio, la inmunomarcación de TNF- α se asoció al citoplasma de las células epiteliales que revisten los conductos y alvéolos mamarios, así como también a células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos intraepiteliales, indicando la presencia de esta citoquina en tejido mamario de cuartos sanos e infectados con *S. aureus*.

TNF- α es una de las citoquinas pro-inflamatorias más importantes producida en reacciones inflamatorias como en mastitis causadas por *S. aureus*. Se ha determinado que *S. aureus* induce una respuesta demorada y disminuida de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 y TNF- α en el huésped (Alluwaimi y col., 2003; Bannerman y col., 2004) en comparación con la respuesta inducida por bacterias Gram negativas como *E. coli*. Si bien se considera que esta respuesta demorada favorecería el establecimiento de la IIM, no se ha determinado aún si esta respuesta inmune diferencial contribuye a la cronicidad de infección bacteriana.

En un estudio previo en el cual cuartos mamarios con IIM crónicas por *S. aureus* y cuartos no infectados fueron tratados al secado con un inmunomodulador a base de LPS o con solución fisiológica, se observó independientemente del tratamiento administrado, un incremento en los porcentajes de inmunomarcación para TNF- α en aquellos cuartos con IIM crónicas en comparación con los no infectados durante las tres primeras semanas post secado (Dallard y col., 2009). De acuerdo con estos resultados, los autores sugirieron que el principal factor que afectó la expresión de TNF- α durante la involución de la GM bovina fue la infección por *S. aureus* y no el tratamiento con el inmunomodulador. Estos reportes coinciden con los resultados obtenidos en este estudio, ya que se presentó una mayor inmunomarcación para TNF- α en GM infectadas crónicamente por *S. aureus* respecto a sanas, observándose un efecto significativo de la IIM, aunque no del tiempo de muestreo. Los resultados obtenidos en este trabajo, en concordancia con los de otros autores, sugieren que TNF- α podría jugar un papel importante no solo en el establecimiento de la IIM, causada por *S. aureus*, sino también en la evolución a la cronicidad, probablemente relacionado al proceso de remodelación de la GM bovina.

Además, otro de los hallazgos de Dallard y col. (2009) fue que el aumento en la inmunomarcación de TNF- α coincidió con un incremento en el número de monocitos-macrófagos CD14+ en cuartos infectados con *S. aureus* respecto a cuartos sanos. En nuestro estudio, como ya se mencionó, el número de células CD14+ fue mayor en GM infectadas respecto a sanas en todos los tiempos evaluados, lo cual coincide con una mayor inmunomarcación de TNF- α en los animales infectados. Estos hallazgos, en conjunto, denotan la importancia de los monocitos-macrófagos presentes en la GM bovina como posible fuente de citoquinas pro-inflamatorias en las infecciones crónicas por *S. aureus* durante la involución.

La IL-1, producto secretado principalmente por monocitos y neutrófilos, incluye entre sus miembros a la IL-1 α e IL-1 β , dos citoquinas clave en la activación de la respuesta inmune innata (Rainard y Riollot, 2006). La IL-1 α permanece en el interior de la célula, mientras que la IL-1 β se secreta. Por esto, se postula que la IL-1 α sirve predominantemente para regular los eventos intracelulares y mediar la inflamación local, mientras que la IL-1 β afecta las respuestas locales e inflamatorias sistémicas. En el presente trabajo se detectaron y cuantificaron las dos formas de la IL-1, la forma α en tejido mamario y la forma β en secreción mamaria.

La mayoría de los efectos biológicos inducidos por la IL-1 en el hospedador en respuesta a una infección son similares a los producidos por TNF- α , incluyendo activación de las células endoteliales y leucocitos, inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda y efectos sistémicos como fiebre (Bannerman, 2009).

Una gran variedad de células han sido identificadas como fuente de IL-1, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos (Barksby y col., 2007). Estudios realizados en la década del 90 por Agace y col. (1993) demostraron, mediante inmunofluorescencia, que la marcación con un anticuerpo anti-IL-1 α se localizaba en el citoplasma de células epiteliales y monocitos sanguíneos de humanos en cultivo cuando eran estimuladas con la cepa Hu734 de *E. coli*. En este estudio, utilizando un anticuerpo específico anti IL-1 α , se observó que esta citoquina se localizó preferentemente en el citoplasma de las células epiteliales que revisten los alvéolos y conductos excretores y en los macrófagos, tanto en tejido mamario proveniente de cuartos sanos como infectados

crónicamente por *S. aureus*. Este hallazgo concuerda con lo observado por Baravalle y col. (2011), donde utilizando el mismo anticuerpo primario, detectaron una localización celular similar para esta citoquina en GM bovina tratada con un MRB a los 7 días de la involución.

Incrementos en la expresión de IL-1 han sido más frecuentemente estudiados y caracterizados en IIM experimentales por *E. coli* en bovinos o en ensayos *in vitro* con líneas de CEM bovinas (Okada y col., 1997; Persson Waller y col., 2003; Bannerman, 2009). En el presente estudio, los porcentajes de inmunomarcación para IL-1 α fueron mayores en los cuartos infectados crónicamente por *S. aureus* respecto a los sanos a los 7 y 14 días de involución, no observándose diferencias al día 21. Aunque la IL-1 α usualmente no es secretada, permaneciendo intracelularmente (Bannerman, 2009), esta citoquina puede ser liberada cuando las células se dañan o mueren (Dinarello, 1996). El aumento en la inmunoexpresión de IL-1 α encontrado en los cuartos mamarios infectados con *S. aureus* en relación a los no infectados, durante las dos primeras semanas de la involución, podría estar relacionado con el aumento de la apoptosis en células epiteliales y estromales mamarias detectada en cuartos infectados con *S. aureus*, punto que se discutirá más adelante en este apartado.

La respuesta de IL-1 β frente a IIM experimentales, comparada con la de otras citoquinas, ha mostrado ser altamente variable (Riollet y col., 2000). En infecciones mamarias experimentales por *E. coli* se ha observado un incremento en las concentraciones de IL-1 β , INF- γ , IL-12, TNF- α e IL-8 en leche en las primeras 48 horas post inoculación; mientras que las últimas dos citoquinas no fueron detectadas tras la infección experimental por *S. aureus*. Esto sugiere que esta respuesta limitada favorecería el establecimiento de la infección por esta bacteria (Bannerman y col., 2004). Sin embargo, los mecanismos determinantes de esa respuesta no han sido totalmente esclarecidos.

En las IIM causadas por *S. aureus*, el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 son las citoquinas pro-inflamatorias predominantes. Se han detectado transcritos de ARNm de estas citoquinas en leche proveniente de vacas con IIM crónicas (Riollet y col., 2000; Riollet y col., 2001) y con IIM agudas experimentales por *S. aureus* (Lee y col., 2006), aunque

la transcripción fue marcadamente menor a la observada frente a infecciones experimentales por *E. coli* (Lee y col., 2006).

Si bien la expresión génica de IL-1 β ha sido demostrada a partir de células somáticas de leche aisladas de GM infectadas con *S. aureus* (Riollet y col., 2001), en relación a la detección de la proteína en leche se han observado resultados discordantes. Riollet y col. (2000) no detectaron esta citoquina en leche luego del desafío experimental con *S. aureus*; en cambio, Banneman y col. (2004) observaron un aumento en las concentraciones de IL-1 β en leche luego de las 32 horas post desafío con la bacteria, manteniéndose por 8 horas adicionales. En el presente estudio, se evaluaron los niveles de IL-1 β en secreciones mamarias provenientes de cuartos con infecciones crónicas por *S. aureus* y cuartos sanos mediante ELISA a diferentes tiempos de la involución. Los resultados mostraron que las concentraciones de IL-1 β fueron mayores en secreciones mamarias provenientes de cuartos infectados con respecto a no infectados durante toda la involución mamaria, lo cual resalta la importancia de esta citoquina pro inflamatoria en las infecciones crónicas por *S. aureus* en la GM bovina durante la etapa de involución activa. En secreciones mamarias de cuartos infectados, el aumento de IL-1 β fue gradual desde la hora 0 (pre secado) hasta las 24 hs post secado donde alcanzó las concentraciones máximas. Posteriormente, las concentraciones de esta citoquina disminuyeron hasta el día 7 para volver a alcanzar niveles elevados al día 21 post secado. No existen antecedentes en la bibliografía sobre estudios en los cuales se hayan cuantificado las concentraciones de citoquinas pro inflamatorias en secreción mamaria proveniente de cuartos infectados con *S. aureus* desde el momento del secado hasta los 21 días post secado, por lo cual no es posible realizar comparaciones con los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otra parte, en las secreciones mamarias provenientes de cuartos no infectados, la presencia de IL-1 β pudo ser detectada en niveles basales durante todos los periodos de la involución evaluados. En relación a este hallazgo, estudios previos (Lee y Outteridge, 1981; Lee y col. 1983; Tatarczuch y col. 1997, 2000) han demostrado que los cambios en los tejidos asociados con la involución mamaria tienen una gran influencia en las células inmunes locales y en la proporción de las diferentes subpoblaciones de leucocitos presentes en la GM. Durante la involución de la GM,

neutrófilos, macrófagos y linfocitos T se hacen presentes tanto en los tejidos glandulares como en las secreciones mamarias (Tatarczuch y col. 1997, 2000). De esta manera, dichas células, habiendo posiblemente migrado desde los tejidos, podrían ser la fuente de las citoquinas presentes en secreciones mamarias de secado. De los resultados obtenidos en tejido y en secreción mamaria para las dos formas de la IL-1 se puede resumir que, la IL-1 α se detectó mayormente en los cuartos mamarios infectados con *S. aureus* a los 7 y 14 días de la involución; mientras que los niveles de la forma β de esta IL en secreción mamaria de cuartos infectados fueron bajos en estos mismos periodos, mostrando los niveles máximos a las 24 hs y a los 21 días post secado.

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica, con propiedades pro y anti-inflamatorias (Bannerman, 2009). Esta citoquina es expresada por una gran variedad de células, incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos, y su expresión es inducida por bacterias y virus, así como por otras citoquinas tales como TNF- α e IL-1 β (Bannerman, 2009). En el presente estudio tanto en cuartos mamarios infectados como en sanos, la localización específica de IL-6 se asoció al citoplasma de las células epiteliales de los alvéolos mamarios y de los conductos excretores. Además, los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos presentaron tinción positiva. Estos hallazgos coinciden con los reportados por Baravalle y col. (2011) en tejido mamario bovino durante la involución.

En el presente trabajo la IL-6 fue detectada y cuantificada en tejido mamario utilizando anticuerpos específicos y en secreción mamaria por ELISA. Los resultados obtenidos de la inmunomarcación de esta citoquina mostraron que su expresión no se vio afectada por la IIM ni tampoco por el tiempo de muestreo, observándose porcentajes de marcación similares entre cuartos infectados y no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución. En contraposición a lo encontrado en tejidos, las concentraciones de IL-6 en secreción mamaria fueron mayores en cuartos infectados con respecto a no infectados en todos los periodos evaluados. Por otra parte, en secreciones provenientes de cuartos infectados, los niveles de IL-6 fueron en aumento con el progreso de la involución, alcanzándose los mayores niveles a los 14 días post secado.

En relación a las células de la leche, se ha observado una mayor expresión de ARNm para IL-6 en células somáticas aisladas de leche proveniente de bovinos con mastitis adquiridas en forma natural (Riollet y col., 2001) o inducidas experimentalmente (Alluwaimi y col., 2003; Lee y col., 2006) en comparación con células aisladas de leche de GM no infectadas. La abundancia relativa de estos transcritos ha sido detectada tanto en vacas infectadas con *E. coli* como con *S. aureus*. Asimismo, en concordancia con nuestros hallazgos, se han observado incrementos en las concentraciones de la IL-6 en leche y sangre de vacas con mastitis adquiridas naturalmente (Hagiwara y col., 2001) e inducidas experimentalmente (Dernfalk y col., 2007).

En el presente trabajo si bien no se observaron diferencias en la expresión de IL-6 entre cuartos infectados y sanos en tejido mamario, sí se observaron diferencias en los niveles de esta citoquina en secreciones mamarias provenientes de animales infectados y sanos. Se ha demostrado que en las etapas tempranas de la IIM por *S. aureus* la reacción inflamatoria está mediada fundamentalmente por macrófagos, neutrófilos y células NK (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). La IIM induce leucocitosis en la leche y los neutrófilos son el tipo celular predominante tanto en mastitis agudas como crónicas (Schalm y col., 1971), jugando un rol clave en las defensas de la GM (Burvenich y col., 2007). En este sentido, las células presentes en las secreciones mamarias de cuartos infectados podrían ser las responsables del aumento en las concentraciones de IL-6 observadas,

En la GM bovina, la inmunidad innata predomina en la etapa temprana de la infección y es mediada por macrófagos, neutrófilos, células natural killer (NK), citoquinas y quimioquinas (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). La respuesta de la GM a la infección bacteriana se caracteriza por la inflamación neutrofílica. La mastitis induce leucocitosis en la leche y los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son el tipo celular predominante tanto en mastitis agudas como crónicas (Schalm y col., 1971). Los PMN juegan un rol clave en las defensas de la GM y su rápida movilización desde la sangre hacia la leche es crucial para prevenir la proliferación de bacterias de crecimiento rápido y la subsecuente mastitis aguda (Burvenich y col., 2007)

En cuanto a la IL-4, se ha demostrado que esta citoquina juega un rol central en la regulación de respuesta inmune y hematopoyesis, tanto en humanos como en ratones. En bovinos, aparentemente participa en la diferenciación de linfocitos B mediante la estimulación de varios marcadores celulares de superficie asociados a la activación y al incremento de la producción de IgG1, IgM e IgE en células B cultivadas *in vitro* (Estes y col., 1994). La IL-4 también posee actividad anti-inflamatoria potente y tiene la capacidad de inhibir la síntesis de las citoquinas pro-inflamatorias y se ha demostrado que es capaz de reducir la mortalidad en varios modelos de choque séptico o endotóxico (Cluitmans y col., 2005).

Seder y col. (1992), en estudios realizados *in vitro* demostraron que la IL-4 es una citoquina crítica que favorece el desarrollo de la respuesta celular Th2. En relación a la expresión génica y proteica de IL-4 en GM bovina y a su rol en las infecciones naturales o experimentales por *S. aureus* existe escasa información. Riollot y col. (2001), evaluaron en bovinos la expresión génica y proteica de citoquinas en leche de animales con infecciones crónicas por *S. aureus* durante la lactancia y detectaron transcritos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como de las citoquinas reguladoras IL-10 e IL-12; sin embargo, no hallaron transcritos de IL-2 ni de IL-4. En cuanto a la IL-4, en los estudios de Riollot y col. (2001) estos autores sólo evaluaron la expresión génica de esta citoquina en leche y no su expresión proteica, por lo cual la ausencia de transcritos en leche no significa que dicha citoquina se secrete a la leche en niveles biológicamente activos.

En el presente estudio, las concentraciones de IL-4 en secreciones mamarias de animales infectados por *S. aureus* fueron mayores a las halladas en secreciones de cuartos sanos durante todos los periodos de la involución evaluados. En secreciones mamarias de cuartos infectados, los niveles máximos de esta citoquina se observaron a las 24 hs post secado, para descender gradualmente hasta las 96 hs post secado y alcanzar valores similares a los del grupo no infectado. A los 7 y 14 días post secado no se observaron diferencias en los niveles de IL-4 entre infectados y no infectados, mientras que a los 21 días los niveles de esta citoquina alcanzaron concentraciones superiores en infectados respecto a no infectados. Las elevadas concentraciones de IL-4 en secreciones mamarias de cuartos infectados detectadas a las 24 hs post secado,

coinciden con las máximas concentraciones observadas para IL-1 β , lo que podría sugerir un intento de regular la reacción inflamatoria generada por la IIM por parte de la IL-4. Lo mismo se observó al día 21 del secado donde ambas citoquinas alcanzaron niveles significativamente superiores en secreciones mamarias de cuartos infectados en comparación con las secreciones de cuartos no infectados. Considerando que la IL-4 favorece la respuesta celular Th2, se puede argumentar que los niveles aumentados en secreción mamaria podrían contrarrestar la acción pro inflamatoria de la IL-1 β en un intento de disminuir la exacerbada reacción inflamatoria ocasionada por la infección bacteriana. Por otra parte, los elevados niveles de IL-4 detectados a los 21 días de la involución en secreciones mamarias de cuartos infectados, coinciden con el máximo número de linfocitos B inmunomarcados en tejido mamario de cuartos infectados, lo que podría sugerir una estimulación de este tipo de linfocitos por parte de la IL-4 a nivel local.

La IL-17 es un citoquina multifuncional que induce la expresión de quimioquinas, citocinas pro inflamatorias y metaloproteasas, y de este modo la estimulación de la inflamación y la quimiotaxis de neutrófilos al sitio de infección (Strzêpa y Szczepanik, 2011). Se ha demostrado que la IL-17A y la IL-17F participan tanto en la inmunidad innata como en la adquirida contra infecciones (Matsuzaki y Umemura, 2007), activando a las células epiteliales para producir quimioquinas de reclutamiento de neutrófilos y productos antimicrobianos (Kolls y Linden, 2004; Kolls y col., 2008; Bougarn y col., 2011).

Se ha demostrado que durante los estadios tempranos de la infección por *S. aureus*, células del sistema inmune innato del hospedador, como macrófagos, producen citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 p70, IL-18, y TNF- α (Buzás y col., 2004). Este ambiente de citoquinas impulsa una respuesta de tipo Th1 y Th17 por parte de linfocitos TCD4+ que es beneficiosa para el control de la infección, pero que si ocurriera de manera exacerbada, podría resultar en un daño sustancial a los tejidos del hospedador. La IL-17 es principalmente producida por linfocitos Th17 en la respuesta inmune adaptativa (Park y col., 2005). Sin embargo, nueva evidencia muestra que linfocitos T *natural killer* (NKT) y células T $\gamma\delta$, son otra importante fuente de IL-17 en los estadios tempranos de la infección (Cua y Tato, 2010).

Si bien se ha demostrado que la IL-17 juega un rol fundamental en las defensas del hospedador contra infecciones tanto bacterianas como fúngicas, en diferentes sitios epiteliales, su rol en las defensas de la GM bovina no ha sido completamente esclarecido (Porcherie y col., 2016).

Rainard y col. (2013) demostraron la producción de linfoquinas IL-17A, IL-17F e IFN- γ en la GM bovina durante la inflamación antígeno-específica inducida con ovoalbúmina (OVA) y además detectaron IL-17A en leche y en tejido mamario por inmunohistoquímica. Estos autores observaron reacción positiva para IL-17A en el citoplasma de las CEM que revisten los alvéolos, en leucocitos asociados al epitelio y en leucocitos que migraron al interior de los alvéolos en los cuartos estimulados con OVA. En el presente estudio, en coincidencia con lo reportado por Rainard y col. (2013), la expresión de IL-17 fue positiva a nivel del parénquima, en el citoplasma de células epiteliales de los alvéolos mamarios y de los conductos de excreción tanto en tejidos provenientes de cuartos mamarios infectados por *S. aureus* como en no infectados. En el tejido conjuntivo interalveolar e intelobulillar se observaron células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos y neutrófilos reactivos a la inmunomarcación. Estos resultados constituyen un fuerte incentivo para identificar y caracterizar las células responsables de la producción de IL-17A en GM bovina y determinar la contribución de esta citoquina a las defensas contra las IIM causadas por *S. aureus*.

Bourgan y col., (2011) demostraron que la estimulación *in vitro* de CEM bovinas con IL-17A conjuntamente con ácido lipoteicoico proveniente de *S. aureus* o muramil dipéptido, ambos agonistas del sistema inmune innato, indujeron un aumento en la expresión de IL-8, CCL20 (quemoquina para leucocitos mononucleares), iNOS (enzima óxido nítrico sintetasa inducible) y CfB (factor b del complemento), indicando que IL-17 ejercería su máximo potencial en un ambiente de infección. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que la IL-17 podría ser una de las citoquinas que intervienen en la modulación de la respuesta inmune de la GM bovina a los patógenos causantes de mastitis como *S. aureus*.

Whelehan y col. (2011) evaluaron la expresión génica de IL-17 tras la infección experimental por *S. aureus* en GM bovina y observaron un incremento en la expresión

de dicha citoquina en diferentes regiones de la glándula, tal como la región alveolar, ductal, cisterna de la glándula y canal del pezón. En el presente estudio, si bien no se evaluó la expresión génica de esta proteína, se evaluó la expresión proteica de la misma en el tejido mamario. De esta manera, el hecho de que los porcentajes de marcación para IL-17 se vieran influenciados por la presencia de la IIM, se condice con lo reportado por estos autores. Por otro lado, los porcentajes de inmunomarcación de esta proteína también se vieron influenciados por el tiempo de la involución, observándose mayores porcentajes de expresión en cuartos infectados con *S. aureus* respecto a los cuartos sanos al día 14 y 21 de la involución, mientras que al día 7 no se observaron diferencias entre cuartos infectados y sanos, lo cual podría indicar que la producción de dicha proteína se incrementa con el avance de la involución en un intento de contrarrestar la infección, mediante la estimulación de la inflamación y la quimiotaxis de neutrófilos al sitio de infección.

Tao y Mallard (2007) evaluaron a partir de células mononucleares de sangre periférica y células somáticas de leche proveniente de animales infectados con *S. aureus* y controles, la expresión de ARNm de 167 genes inmuno-endocrinos mediante microarreglos. Entre otros, los resultados mostraron una sobre expresión de ARNm para IL-17 en células somáticas de leche de animales infectados pero no en células mononucleares de sangre periférica de animales infectados; lo cual indicaría que la IL-17 podría desempeñar un rol en la respuesta local a la infección, pero no a nivel sistémico (Tao y Mallard, 2007).

Los resultados obtenidos por otros autores en conjunto con los del presente estudio, demuestran la implicancia de esta citoquina en las IIM por *S. aureus* en bovinos indicando que juega un rol en la patogenia de la infección crónica por este patógeno. Asimismo la inmunomarcación observada en componentes del parénquima mamario y en células inmunes en tejido mamario de cuartos no infectados, podría sugerir un rol de esta citoquina durante la remodelación de la GM bovina durante el periodo de involución activa.

6.1.4- Lactoferrina

Los factores solubles involucrados en la inmunidad innata son principalmente proteínas e incluyen, entre otros, a la Lf. Ésta es una glicoproteína multifuncional que posee habilidad para unirse al hierro y se localiza en diversas secreciones, entre ellas la leche. Esta proteína está presente en los gránulos secundarios de los leucocitos polimorfonucleares y es sintetizada por las células epiteliales de la GM bovina y en menor medida por neutrófilos y macrófagos (Hurley y Rejman, 1993; Oviedo-Boyso y col., 2007)). La principal función de la Lf es proteger a la GM contra infecciones bacterianas en el período de involución, junto a la activación de la fagocitosis y del sistema de complemento (Kai y col., 2002; Sordillo y Streicher 2002; Lee y col., 2004).

Hurley y Rejman (1993), mediante IHQ, observaron que la presencia de Lf en tejido mamario se asoció al citoplasma de las células epiteliales mamarias y a la región basal del epitelio alveolar, posiblemente en asociación con componentes de la membrana basal. Estos autores también reportaron que la inmunomarcación se incrementó durante la involución en comparación con la lactancia. En el presente estudio la expresión de Lf se vio asociada al citoplasma de las células epiteliales de la GM bovina y a células del sistema inmune, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos.

Es conocido que los principales agentes patógenos causantes de IIM en bovinos tales como *E. coli*, *S. uberis*, *S. aureus*, entre otros, despliegan diferentes estrategias de infección e inducen en consecuencia respuestas inmunes disímiles por parte de la GM (Hagiwara et al., 2003; Bannerman et al., 2004; Wellnitz and Kerr, 2004; Wellnitz y Bruckmaier, 2012). En este sentido, Chanetton y col. (2008) demostraron que las concentraciones de Lf durante el periodo seco fueron mayores en leche proveniente de cuartos infectados con respecto a leche de cuartos sanos. Además, los niveles de Lf fueron mayores en leche proveniente de cuartos infectados con patógenos mayores, respecto a la de cuartos infectados con patógenos menores y los mayores niveles detectados correspondieron a los cuartos infectados con *S. uberis*. Por otra parte, estos mismos autores reportaron que la susceptibilidad a la Lf fue altamente variable entre especies y cepas bacterianas, y que mientras *S. aureus* y *E. coli* mostraron ser susceptibles a la acción de la Lf *in vitro*, *S. uberis* mostró resistencia a la actividad antimicrobiana de la Lf. Por otro lado Sordillo y col. (1987) reportaron que en cuartos

infectados con patógenos mayores se registraron concentraciones significativamente menores de esta proteína, por lo que dichos autores sugirieron que menores niveles de este componente antibacteriano podría contribuir a disminuir las defensas naturales contra dichos patógenos, resultando finalmente en la infección. En el presente estudio, tanto en cuartos infectados por *S. aureus* como en cuartos libres de infección, los porcentajes de inmunomarcación para la Lf fueron en aumento desde el día 7 hasta día 14 de la involución observándose porcentajes de marcación similares. A los 21 días de la involución, los porcentajes de marcación para Lf en cuartos mamarios no infectados fueron máximos, mientras que en los cuartos infectados los porcentajes disminuyeron en forma significativa. En relación a los resultados obtenidos, en cuartos mamarios no infectados, los mayores porcentajes de inmunomarcación para Lf observados al día 21 se condicen con los niveles aumentados de esta proteína en secreción mamaria durante el proceso de involución normal de la GM bovina (Smith y Oliver, 1981). Por otra parte, la disminución significativa en la expresión proteica de dicha proteína en los cuartos mamarios infectados con *S. aureus* al día 21 post secado podría contribuir a generar un microambiente apropiado para la persistencia de *S. aureus* en la GM bovina.

6.2. Respuesta inmune adaptativa

6.2.1- Linfocitos T y B

En la GM, el número y la distribución de los leucocitos son importantes para el éxito de las defensas contra los patógenos de mastitis. Por otra parte, su distribución en diferentes compartimentos de la GM puede tener un papel importante en la protección contra los patógenos y/o en la recuperación de la infección. Numerosos estudios se han enfocado en el estudio de las células somáticas y su distribución en la leche, pero los leucocitos que se encuentran en el tejido mamario difieren de los de la leche y pueden jugar un rol más importante que el de las células somáticas en la respuesta inmune (Leitner y col., 2003).

Los linfocitos se han detectado en gran número, tanto en tejido mamario como en sus secreciones (Sordillo and Nickerson, 1988; Lee y col., 1989; Schwarz y col., 2011a,b). El predominio de los linfocitos en GM sanas sugiere que este tipo celular juega un importante papel en el mantenimiento de la integridad de la GM (Shafer-Weaver y col., 1996) y en la defensa del hospedador contra enfermedades infecciosas de la GM (Sordillo y col., 1991). La literatura indica que los linfocitos de la GM son capaces de realizar una amplia gama de funciones efectoras, incluyendo acciones citotóxicas, supresoras y antibacterianas (Sordillo y col., 1991; Park y col., 1993).

En el presente estudio, la identificación de linfocitos T y B en tejido mamario de cuartos infectados y sanos, se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos anti-CD2 para linfocitos T, y anti-CD79 para linfocitos B. El CD2, también conocido como T11 y LFA-2, es un tipo glicoproteínico que facilita la adhesión intercelular, lo que contribuye a la unión del linfocito T a la célula presentadora. Su ligando natural es el CD58 (LFA-3) y se expresa en la superficie de todas las células con función presentadora de antígenos. Se expresa en linfocitos T, timocitos y células NK (Janeway y col., 2001). Por otro lado, el CD79 es requerido, en cooperación con CD79b, para la iniciación de la cascada de transducción de señales activadas por la unión del antígeno al complejo receptor de antígeno de células B (BCR) que conduce a la internalización del complejo, el tráfico a los endosomas tardíos y la presentación de antígenos. También se requiere para la expresión de BCR en la superficie y para la diferenciación eficiente de pro y pre-linfocitos B (Chu y col., 1999; Knowles y col., 2001; Waarnker y col., 2001). En la bibliografía no se han encontrado estudios en los cuales se utilice anti-CD79 para detección de linfocitos B por IHQ en tejido mamario bovino. Sí, se ha reportado su uso en tejidos humanos para expresar un amplio rango de maduración de linfocitos B, desde las células más inmaduras a las células plasmáticas (Chu y col., 1999; Knowles y col., 2001; Waarnker y col., 2001).

Los linfocitos son una parte importante de la defensa inmune adaptativa contra las IIM, pero el tráfico de diferentes subconjuntos de linfocitos durante las fases aguda y crónica de la mastitis por *S. aureus* no se ha dilucidado completamente (Grönlund y col., 2006). La mayoría de los estudios sobre el efecto de la mastitis por *S. aureus* en subpoblaciones de linfocitos se ha realizado a partir de muestras de leche y sangre y

se han centrado tanto en mastitis clínica aguda (Taylor y col., 1997; Soltys y Quinn, 1999; Grönlund y col., 2006) como en mastitis subclínica crónica (Grönlund y col., 2006; Shoshani y col., 2000; Riollet col., 2001; Nagahata y col., 2011). Durante las IIM causadas por *S. aureus* en GM bovina se han reportado incrementos tanto de linfocitos T CD4+ como CD8+ y un predominio de este último tipo de células cuando la infección se establece, sugiriendo un importante rol de los linfocitos CD8+ en la mastitis crónica causada por *S. aureus* (Riollet y col., 2001; Rivas y col., 2002; Grönlund y col., 2006).

En bovinos, Grönlund y col. (2006) demostraron cambios en las proporciones de linfocitos CD4+ y CD8+ obtenidos a partir de leche en cuartos infectados experimentalmente con *S. aureus*, reportando un aumento de la relación CD4+:CD8+ en la fase aguda de la infección y un cambio en la relación con predominio de células CD8+ a los 22 y 26 días durante la fase crónica de la IIM. Sin embargo, a los 29, 33 y 36 días post infección los autores volvieron a observar un predominio de los linfocitos CD4+. Por otra parte, Riollet y col. (2001), también observaron un reclutamiento mayor de linfocitos CD8+ en comparación con linfocitos CD4+ en leche procedente de vacas infectadas crónicamente por *S. aureus*, siendo más pronunciados estos tipos de linfocitos a los 5 días post infección. En el presente estudio, no fue posible establecer la relación CD4+:CD8+ ya que el anticuerpo utilizado para identificar y cuantificar linfocitos T en tejido mamario (anti-CD2) no discrimina entre poblaciones celulares. Asimismo, los leucocitos que se encuentran en el tejido mamario difieren de los de la leche y posiblemente jueguen roles diferentes en la respuesta inmune de la GM contra los patógenos. En cuanto a la localización de linfocitos T, en el presente estudio, los mismos se distribuyeron principalmente en el tejido conjuntivo del estroma mamario y en menor número en la luz de alvéolos y conductos. En los cuartos mamarios infectados con *S. aureus* los linfocitos T se distribuyeron formando acúmulos en el tejido conjuntivo interalveolar. Por otra parte, en concordancia con los incrementos de linfocitos T reportados por otros autores en secreción mamaria de animales infectados por *S. aureus* (Riollet y col., 2001; Rivas y col., 2002; Grönlund y col., 2006), en este estudio, se observó un efecto significativo de la infección sobre el número de linfocitos T cuantificados en el tejido mamario, registrándose un número mayor de células/unidad de área en cuartos infectados por *S. aureus* respecto a cuartos no

infectados. En cuartos infectados, a los 7 y 14 días de la involución el número de linfocitos T fue mayor al hallado en cuartos sanos, no así al día 21 donde el número de células fue similar. Así también, el mayor número de linfocitos T en cuartos infectados se detectó al día 7, decreciendo progresivamente hacia el día 21.

Un mecanismo utilizado por el sistema inmune para aumentar la fagocitosis y la muerte de los microorganismos infecciosos es la producción de anticuerpos específicos a niveles suficientes en el sitio de infección (Leitner y col., 2000). Como *S. aureus* puede invadir y sobrevivir intracelularmente, una estimulación preferencial de las células B, que sugiere el desarrollo de una respuesta humoral, puede ser insuficiente para eliminar las bacterias intracelulares, lo que podría explicar la persistencia de la infección (Wellnitz y col., 2012). Estudios previos han reportado aumentos en la proporción de linfocitos B en sangre de bovinos con mastitis subclínica crónica (Grönlund y col., 2006), mientras que otros no hallaron modificaciones en cuanto a las subpoblaciones celulares en sangre proveniente de animales infectados (Riollet y col., 2003).

Leitner y col. (2003), observaron que el número de linfocitos B marcados con anti CD21 en tejidos mamarios provenientes de bovinos con IIM crónicas por *S. aureus* fue similar al hallado en tejidos mamarios provenientes de animales sanos. Asimismo, observaron que los linfocitos B se localizaron en el tejido conjuntivo formando acúmulos de 3-5 células principalmente en áreas carentes de alvéolos. En nuestro estudio, la marcación con anti CD79 se detectó a nivel del citoplasma de los linfocitos B, los cuales se distribuyeron formando acúmulos principalmente en el tejido conjuntivo interalveolar. En cuanto a la cuantificación de los linfocitos B, se observó un efecto significativo de la IIM sobre el número de estas células cuantificadas en el tejido, observándose un mayor número/unidad de área en cuartos infectados respecto a no infectados durante todos los periodos de la involución estudiados. En cuartos infectados, el número de linfocitos B fue mayor al reportado en cuartos no infectados en todos los periodos, observándose un aumento progresivo con el avance de la involución. Las diferencias detectadas con el trabajo de Leitner y col. (2003) podrían relacionarse principalmente con el periodo de estudio, ya que si bien estos autores utilizaron tejidos mamarios provenientes de animales crónicamente infectados con *S.*

aureus y no infectados los mismos se obtuvieron en la mitad de la lactancia. Por otra parte, el comportamiento observado de los linfocitos B en cuartos infectados, fue inverso al de los linfocitos T, ya que estos últimos disminuyeron con el progreso de la involución.

Schwarz y col. (2013), utilizando citometría de flujo, investigaron la relación cuantitativa entre linfocitos T CD2+ y linfocitos B CD21+ en leche y observaron una correlación positiva entre el índice CD2/CD21 y el estado bacteriológico de los cuartos mamarios estudiados, en especial cuando se detectó la presencia de patógenos mayores. Además, los porcentajes de linfocitos T CD2+ fueron mayores en muestras de leche provenientes de cuartos sanos, mientras que los porcentajes de linfocitos B CD21+ fueron mayores en muestras de leche provenientes de cuartos infectados. Este incremento de linfocitos B en cuartos infectados confirma los resultados obtenidos por otros autores en estudios previos (Riollet y col. 2001; Mehrzad y col. 2008), y sugiere el desarrollo de una respuesta inmune humoral. En el presente estudio, en cuartos infectados, el número de linfocitos B/unidad de área fue mayor que el número de linfocitos T/unidad de área en todos los periodos estudiados. Este hallazgo resalta la importancia funcional de los linfocitos B en las infecciones crónicas por *S. aureus* durante la involución mamaria.

De los resultados hallados se desprende que el mayor número de linfocitos T y B observado en el tejido mamario de cuartos infectados crónicos respecto al de los no infectados, en coincidencia con el aumento de los componentes de la respuesta inmune innata, indican el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa frente a la infección por *S. aureus* que es sostenida durante la involución activa, sin embargo, no es completamente efectiva para eliminar al patógeno de la GM. Los resultados hallados en este apartado aportan nuevos conocimientos acerca de la influencia de la infección crónica por *S. aureus* durante el proceso de remodelación de la GM bovina sobre la estimulación de la respuesta inmune adaptativa.

*En cuanto al Objetivo específico Nro. 3: Evaluar la expresión proteica de componentes de la subfamilia de TGF- β , los cambios morfométricos del parénquima y estroma mamario y la expresión proteica de colágeno I estableciendo diferencias entre cuartos sanos e infectados con *S. aureus*.*

6.3. Cambios morfométricos

En este trabajo se evaluó el efecto de la IIM crónica por *S. aureus* en la expresión proteica de los componentes de la subfamilia TGF- β , durante la involución mamaria. Además, se determinó la influencia de la infección crónica en la expresión de colágeno I, así como los cambios histomorfométricos acontecidos en parénquima y estroma durante la involución activa.

Todos los componentes de la subfamilia TGF- β evaluados se expresaron tanto en parénquima como en estroma, en cuartos infectados crónicos por *S. aureus* y sanos, en todos los periodos evaluados. Estos hallazgos coinciden con estudios previos en bovinos, donde los componentes de TGF- β fueron detectados en parénquima y estroma mamario por IHQ (Plaut y col., 2003; De Vries y col., 2010). Sin embargo, la contribución de los TGF- β a los procesos patofisiológicos que operan en la GM; durante IIM por *S. aureus* no está aún definida.

En el presente estudio, la expresión proteica de las tres isoformas de TGF- β evaluadas fue significativamente mayor en cuartos infectados crónicos respecto a cuartos sanos. Se ha demostrado que TGF- β suprime la inflamación, regulando negativamente la producción de quemoquinas y citoquinas pro-inflamatorias (Fargeas y col., 1992; Flanders y Wakefield, 2009) y estimulando la actividad de los macrófagos para la eliminación de residuos bacterianos, células inflamatorias y células dañadas del parénquima (Letterio y Roberts, 1998; Ashcroft, 1999; Flanders y Wakefield, 2009). En un estudio previo Dallard y col. (2009) observaron un incremento en el número de monocitos-macrófagos marcados con anti CD14 en cuartos mamarios infectados crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución, indicando la participación de estas células en la reacción inmune local de la GM contra este patógeno. el incremento en la expresión de las tres isoformas de TGF- β observado en este estudio, así como los resultados aportados por trabajos previos (Dallard y col.,

2009), sugieren que estas citoquinas podrían estar implicadas en la reparación de células dañadas del parénquima durante las infecciones crónicas causadas por *S. aureus* durante la involución mamaria. En este estudio, como ya se mencionó, se observó un incremento en el número de monocitos-macrófagos marcados con anti CD14 en tejidos provenientes de cuartos mamarios infectados con *S. aureus* durante los tres periodos de la involución evaluados, lo cual indicaría que estas células no sólo constituyen el tipo celular predominante durante el periodo seco (Rainard y Riollet, 2006), sino que además su número se ve incrementado en respuesta a la infección. Los macrófagos producen diferentes tipos de citoquinas, entre las que se encuentra el TGF- β , lo cual se relaciona con el papel de estas células en la remodelación de la glándula, además de su participación en la respuesta infamatoria frente a la infección por *S. aureus*.

Un estudio previo realizado *ex vivo* en GM bovina (Zarzynska y col., 2007) reveló que un incremento en el alcance de la apoptosis medido mediante la expresión de CPP-32 y del fragmento de 89 kDa de poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (un producto de la actividad de caspasa-3) durante el periodo seco, estuvo acompañado por un incremento significativo en la expresión de TGF- β 1 y del receptor TGF- β R2. Estos resultados podrían indicar la existencia de una relación causal entre la expresión de esta citoquina y la inducción de apoptosis *in vivo*, como ha sido reportado previamente usando cultivos de CEM bovinas exponiéndolas a TGF- β 1 exógeno (Kolek y col., 2003; Gajewska y Motyl, 2004; Gajewska y col., 2005; Zarzynska y Motyl, 2005). En un estudio previo, Dallard y col. (2008), observaron un incremento en la apoptosis de células epiteliales y estromales de la GM bovina mediante la utilización de la técnica TUNEL, así como la expresión de caspasa-3 activa en cuartos sanos e infectados crónicamente por *S. aureus*, durante las primeras tres semanas de involución.

En el presente estudio, la inmunexpresión para TGF- β 1 fue significativamente mayor en cuartos infectados crónicamente por *S. aureus* respecto a cuartos sanos en todos los tiempos evaluados, siendo la mayor expresión al día 14 de involución. Por otra parte, en concordancia con los resultados obtenidos por Dallard y col. (2008), en este trabajo la expresión de proteínas pro-apoptóticas, de caspasa-3 activa y de células

apoptóticas evaluadas por TUNEL, fueron mayores en cuartos infectados crónicos con respecto a no infectados durante la involución. Estos resultados en su conjunto podrían indicar la participación de TGF- β 1 en la regulación de la apoptosis de las células epiteliales y estromales de la GM en cuartos infectados crónicos por *S. aureus*.

Musters y col. (2004) demostraron que TGF- β 1 actúa selectivamente en el estroma de la GM bovina, incrementando la proliferación celular y la expresión génica de la proteína de la matriz extracelular fibronectina. En un estudio previo se observó un incremento significativo en la proliferación de células estromales así como una baja relación apoptosis/proliferación en células estromales, en cuartos infectados crónicamente por *S. aureus* respecto a no infectados, a los días 7, 14 y 21 de involución, indicando un incremento en la proliferación de estas células durante las primeras tres semanas de involución (Dallard y col., 2008). En el presente estudio, si bien la relación proliferación/apoptosis en células estromales fue mayor en cuartos infectados crónicos respecto a no infectados, la diferencia sólo fue significativa al día 14 de la involución, indicando una alta tasa de recambio celular en este periodo. El incremento en la expresión de TGF- β 1 observado en este trabajo en cuartos con infección crónica por *S. aureus*, podría representar un mecanismo para disminuir el daño tisular o contribuir con los mecanismos de reparación celular o ambos.

Estudios previos han demostrado que la respuesta inmune del hospedador varía en concordancia con la cepa de *S. aureus* (Atallay col., 2009; Kim y col., 2011). Kim y col. (2011) observaron un notable incremento en las concentraciones de TGF- β en suero durante la fase crónica de infección experimental con cepas Heba 3231 *small colony variant* (SCV) de *S. aureus* (aisladas de un animal con historial de mastitis crónica), en comparación con la cepa parental 3231 y la cepa Newbould 305. Aunque la caracterización molecular de los aislados de *S. aureus* causantes de IIM crónicas va más allá del alcance del presente estudio, pudo observarse un incremento en la expresión proteica de TGF- β 1 en tejidos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* respecto a sanos.

Se ha demostrado que tanto TGF- β 2 como 3 ejercen efectos similares al de TGF- β 1 en la GM (Robinson y col., 1991). Si bien TGF- β 1 y 2 se han detectado en leche (Jin y col., 1991; Ginjala y Pakkanen, 1998), TGF- β 2 es el que predomina en este tipo de

secreción (Jin y col., 1991; Chockalingam y col., 2005). Bannerman y col. (2006) observaron un incremento en la producción de TGF- β 1 y 2 en leche de bovinos con IIM por *S. aureus* durante la lactancia media. Se ha demostrado que las tres isoformas de TGF- β estimulan la formación de tejido conectivo y son quimiotácticas para fibroblastos (Akers, 2006). En el presente estudio, la expresión proteica de TGF- β 2 se asoció a componentes del estroma y parénquima mamario y fue significativamente mayor en cuartos infectados crónicamente por *S. aureus* respecto a sanos en todos los periodos evaluados. Más aún, los porcentajes de inmunomarcación para TGF- β 3 fueron significativamente mayores en cuartos infectados crónicamente por *S. aureus* respecto a cuartos sanos, en los tres tiempos evaluados. Al igual que para TGF- β -1, los máximos porcentajes de marcación para TGF- β 3 se observaron al día 14 de la involución, periodo en el cual ocurren la mayoría de los cambios morfológicos en el parénquima y estroma mamarios, como se reportó en estudios previos llevados a cabo en animales sanos (Holst y col., 1987; Sordillo y Nickerson, 1988; Capuco y col., 1997) y en GM infectadas por *S. aureus* (Dallard y col., 2008).

TGF- β ejerce sus efectos biológicos mediante la unión a tres receptores celulares de superficie con alta afinidad, los receptores de TGF- β tipo 1, 2 y 3 (también conocido como betaglicanos), y la familia de factores de transcripción Smad (Schmierer y col., 2007; Daly y col., 2008). Se ha demostrado que el receptor tipo 3 mejora la unión de ambos tipos de TGF- β con el receptor tipo 2 y la señalización de TGF- β (Plaut y col., 2003). Muniain y Plaut (1996) demostraron que los tres tipos de receptores están presentes en tejido mamario de ratones en diferentes estadios del desarrollo, siendo el receptor de tipo 3 el más abundante. De acuerdo con otros reportes previos (Plaut y col., 2003), en el presente estudio, se detectó la presencia en tejido mamario de los receptores tipo 1 y 3, los cuales se expresaron abundantemente a lo largo del epitelio ductal y alrededor de los alvéolos. De Vries y col. (2010) observaron una mayor intensidad de marcación para el receptor tipo 2 en el epitelio con respecto al estroma mamario. En este trabajo, se observó una marcación débil y difusa de TGF- β R1 y R3, tanto en el estroma intra como interlobulillar. Las células estromales como fibroblastos mostraron una tinción moderada a nivel del citoplasma perinuclear, en concordancia con lo reportado por Plaut y col. (2003). Más aún, se observó una reacción positiva en

el citoplasma de células mioepiteliales y células inmunes (monocitos-macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), lo cual concuerda con la inmunomarcación observada para las diferentes isoformas de TGF- β detectadas en este trabajo.

La expresión proteica de TGF- β R1 y 3 estuvo significativamente afectada por la infección con *S. aureus* y por el tiempo de muestreo. A los días 7, 14 y 21 de involución los porcentajes de inmunomarcación para los dos receptores evaluados fueron significativamente mayores en cuartos infectados crónicamente con *S. aureus* respecto a sanos. La mayor expresión proteica se observó también al día 14 de involución en cuartos infectados, sugiriendo que estos receptores podrían estar jugando un rol en la modulación de la actividad de TGF- β 1 y TGF- β 3 en GM infectadas crónicamente con *S. aureus* respecto a sanas durante la involución activa.

El incremento en la expresión de los componentes de la subfamilia TGF- β observado en cuartos infectados crónicamente con *S. aureus* respecto a sanos a lo largo de la involución activa es indicativo de una respuesta inmune sostenida. Sin embargo, cómo esta respuesta contribuye al intento de eliminar al patógeno de la GM no está claro todavía, siendo que la IIM tiende a persistir durante la involución (Sordillo y col., 1989). Probablemente se podría sugerir, que esta respuesta inmune sostenida contribuye a evitar la difusión del patógeno a través de un incremento en la cantidad de tejido conjuntivo fibroso y la potencial encapsulación del agente infeccioso.

De Vries y col. (2011) demostraron *in vivo* que un tratamiento a corto plazo con TGF- β 1 en GM bovina produjo un incremento en el número de fibroblastos activados y un aumento en el índice de proliferación de células epiteliales y fibroblastos. En el presente estudio, en cuartos infectados crónicos con *S. aureus*, se observó una estructura continua de colágeno rodeando los alvéolos y grandes conductos en la zona adyacente al epitelio, así como también marcación intensa del colágeno del estroma intralobulillar. Los porcentajes de inmunomarcación para el colágeno I fueron significativamente mayores en cuartos infectados crónicamente con *S. aureus* respecto a sanos en todos los tiempos de involución evaluados, presentándose la mayor expresión al día 21. Este incremento en la expresión de colágeno I en cuartos infectados coincide con el incremento progresivo de los porcentajes de área de estroma intralobulillar. Capuco y col. (1997) hallaron que la hidroxiprolina, un marcador de la

síntesis de colágeno, se incrementó paralelamente con el área estromal durante la involución en vacas lecheras, sugiriendo que dichos cambios serían el resultado directo de un incremento en la síntesis de matriz extracelular, más que un cambio en el estroma por compresión o variación de la elasticidad (Capuco y col., 1997). De acuerdo con esta hipótesis, en el presente estudio, el incremento observado en el área ocupado por estroma intralobulillar en cuartos infectados durante la involución, resultaría de un incremento en la producción de proteínas del estroma, ya que la expresión proteica de colágeno I se vio significativamente aumentada a lo largo de todo el periodo de muestreo.,

Previamente se han llevado a cabo estudios morfométricos en GM de vacas en lactancia e involución (Heald, 1979; Nickerson y Heald, 1981; Sordillo y Nickerson, 1988; Akers y Nickerson, 2011). Los porcentajes de área de tejido mamario compuesta por epitelio y lumen decrecieron durante la involución de la glándula, mientras que los porcentajes de área correspondiente al estroma se incrementaron, alcanzando un pico entre los días 14 y 25 luego del cese de la lactancia (Sordillo and Nickerson, 1988; Capuco y col., 1997). Los cambios en los porcentajes de parénquima y estroma observados en este estudio en cuartos no infectados, se corresponden con los cambios descritos durante la involución normal de la GM bovina entre los días 7 y 21 luego del secado (Holst y col., 1987).

La respuesta del tejido mamario frente a IIM naturales o experimentales por *S. aureus* ha sido cuantificada en vacas lecheras usando técnicas histológicas y citológicas. En general, los cuartos con infecciones naturales muestran una reducción en la habilidad del tejido secretor para sintetizar y secretar leche; presentando menores porcentajes de áreas de tejido ocupadas por lumen y epitelio, y mayores áreas de estroma inter alveolar (Akers and Nickerson, 2011). Heald (1979) observó que tejidos mamarios de vacas en lactancia inoculadas con *S. aureus* mostraron menor síntesis y secreción de leche, presentando mayor proporción de estroma inter alveolar, epitelio alveolar en involución y menor espacio luminal alveolar comparado con controles no infectados. Más aún, esos cambios estuvieron asociados con el reemplazo de tejido secretor por tejido no secretor (Nickerson y Heald, 1981). Trinidad y col. (1990) observaron que tejidos provenientes de cuartos infectados con *S. aureus* mostraron

menor desarrollo, exhibiendo menor epitelio alveolar y áreas lumbinales y más estroma comparados con tejidos de cuartos de animales sanos.

En el presente estudio, los porcentajes de áreas de tejido compuestas de parénquima fueron significativamente mayores en cuartos infectados respecto a sanos, siendo esto más pronunciado a los días 14 y 21 de involución. Este incremento en los porcentajes de parénquima observados en cuartos con infecciones crónicas por *S. aureus* podría estar relacionado con la presencia de alvéolos con lúmenes distendidos y de gran tamaño debido a la acumulación de productos secretorios, células desprendidas, material de aspecto hialino y al exudado de neutrófilos. De esta manera, el aumento de los porcentajes de parénquima observados en este estudio no serían indicadores de mayor actividad secretoria. De acuerdo con reportes previos (Sordillo y col., 1989), en el presente estudio, los porcentajes de estroma intralobulillar fueron significativamente mayores en cuartos con mastitis por *S. aureus* respecto a aquellos no infectados. En relación al estroma interlobulillar, en cuartos infectados, la media de los porcentajes se mantuvo sin cambios a lo largo del periodo de muestreo y fue significativamente más baja que la observada en cuartos sanos.

En relación a los resultados obtenidos en este apartado, se puede resumir que en GM crónicamente infectadas con *S. aureus* los componentes de la subfamilia de TGF- β se asociaron a la presencia de abundante colágeno I en el tejido conjuntivo intralobulillar durante la involución activa. Este incremento observado en los componentes del estroma en la mastitis causada por *S. aureus* podría conducir a una involución aberrante de la GM con permanencia del tejido parenquimatoso no secretor e incremento de tejido conjuntivo intralobulillar. La mayor expresión de las tres isoformas de TGF- β y de los receptores tipo 1 y 3 en cuartos con infecciones crónicas por *S. aureus* podría considerarse un mecanismo de respuesta esencial para limitar el alcance de la inflamación y la injuria al tejido mamario.

*En cuanto al **Objetivo específico Nro. 4:** Caracterizar los inhibidores intramamarios de la proliferación celular e inductores de la apoptosis y proteínas regulatorias intracelulares, estableciendo diferencias entre cuartos sanos e infectados con *S. aureus*.*

6.4. Proliferación y apoptosis

En bovinos ha sido bien documentado que el periodo no lactante previo al parto es esencial para garantizar una óptima producción de leche en la próxima lactancia (Sorensen y Enevoldsen, 1991). La GM sufre procesos de remodelación, que incluyen regresión (apoptosis), proliferación y diferenciación de células mamarias a fines de prepararse para la lactancia siguiente (Capuco y col. 1997; Bachman y Schairer, 2003).

La integración de señales de muerte o supervivencia determinan el destino de un tejido o célula. El éstasis de leche luego del secado, determina la expresión de proteínas de supervivencia y muerte dentro de la GM. La presencia de proteínas de supervivencia durante la involución temprana de la GM 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 conduce al tejido a la involución irreversible (Capuco y col., 2002).

La apoptosis es una forma de muerte celular ATP dependiente, caracterizada morfológicamente por condensación de la cromatina, fragmentación del ADN 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 ADN y al clivaje de proteínas reguladoras claves que llevan a la muerte celular (Yin y col., 2000).

En investigación celular es muy importante caracterizar la apoptosis por múltiples métodos, considerando el hecho de que usando análisis variados se pueden detectar diferentes procesos apoptóticos (D'haeseleer y col., 2005). En el presente

estudio, se analizaron los efectos de la IIM crónica causada por *S. aureus* sobre la inmunoexpresión de proteínas reguladoras de la apoptosis tales como Bcl-2 y Bax, sobre la inmunoexpresión de caspasa-3 activa, sobre la apoptosis *in situ* mediante la técnica de TUNEL, sobre la proliferación celular a través de la inmunomarcación de Ki-67 así como sobre el balance proliferación/apoptosis relacionando los porcentajes obtenidos para Ki-67 y TUNEL en GM bovina durante la involución. Todos los componentes evaluados se expresaron en células del parénquima y del estroma mamario, tanto en cuartos infectados como en no infectados durante todos los periodos de la involución evaluados. Esos hallazgos coinciden con estudios previos en GM bovina, en los cuales se detectaron componentes similares mediante IHQ (Dallard y col., 2008; Dallard y col., 2011) en diferentes etapas de la involución.

Uno de los principales reguladores de la apoptosis es la familia de proteínas Bcl-2 (Reed, 2000; Schorr y col. 1999). Los mecanismos mediante los cuales estas proteínas, entre las que se encuentran proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y proapoptóticas como Bax, regulan la apoptosis no están completamente definidos pero se sabe que involucran cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Colitti, 2012). Patrones de expresión de miembros individuales de la familia Bcl-2 en la GM son regulados durante el desarrollo ductal, la preñez, la lactancia y la involución (Heermeier y col., 1996; Humphreys, 1999). Se ha demostrado que en GM de ratón, Bcl-2 se expresa en niveles elevados durante la preñez temprana, no así durante el final de la preñez donde es regulado negativamente; asimismo, durante la lactancia y la involución temprana su expresión permanece baja para aumentar nuevamente al final de la involución (Pullan y col., 1996). Por su parte, Schorr y col. (1999) demostraron que en GM de ratón los niveles de expresión génica para Bax disminuyen hacia el final de la involución, mientras que los de Bcl-2 se incrementan (Schorr y col. 1999a). Estos mismos autores, realizaron un estudio durante la lactancia e involución en ausencia de Bax, y observaron que dicha ausencia redujo la muerte celular por apoptosis durante la involución temprana de la GM, sugiriendo un importante rol para esta proteína en las primeras etapas de la involución post destete en ratones (Schorr y col. 1999b). Estudios en GM de cabras durante la lactancia e involución revelaron que la expresión génica de Bax fue baja en el pico de la lactancia, para incrementarse

significativamente al final de la lactancia y permanecer elevada durante la involución (Wareski y col. 2001). Esto se condice con los estudios en GM porcina donde se observó un incremento en la expresión de Bax durante la involución del tejido secretor (Motyl y col. 2001).

En un estudio realizado por Colitti y col. (1999) en GM de ovejas, la inmunoexpresión para Bax se detectó en las células epiteliales al día 1 del cese de la lactancia y se incrementó con el progreso de la involución. En este periodo, la marcación para Bax fue débil y limitada a la región apical de las células epiteliales mientras que al día 2 y 4 la marcación fue intensa. A los 8 días del cese de la lactancia la inmunorreactividad para Bax se detectó en el citoplasma de las células epiteliales. Con respecto a Bcl-2, en los estudios de Colitti y col. (1999), la inmunorreactividad se asoció a dominio apical de las células epiteliales mamarias observándose marcación sólo al día 1 y 8 de la involución. Dallard y col. (2011) en un estudio realizado en GM bovinas no infectadas tratadas con un inmunomodulador a base de *Panax ginseng* y placebo al final de la lactancia observaron que al día 7 post secado, la inmunomarcación para Bax y Bcl-2 se asoció a las células del parénquima y estroma mamario con marcación intensa en el citoplasma y en el núcleo principalmente en la zona de la membrana nuclear. En el presente estudio, en concordancia con los estudios mencionados, la inmunomarcación para Bax y Bcl-2 se observó en todas las secciones de tejido provenientes de cuartos mamarios infectados y no infectados, en intensidades diferentes, principalmente asociada a estructuras del parénquima. La reacción positiva se presentó en los núcleos, particularmente alrededor de la membrana nuclear y en el citoplasma de células epiteliales y estromales.

Los mecanismos involucrados en el daño ocasionado al tejido durante las IIM no han sido totalmente esclarecidos, pero incluyen tanto apoptosis como necrosis. Estos dos tipos de muerte celular difieren en cuanto a los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que producen en las células destinadas a morir (Fink y Cookson, 2005). Estudios recientes han demostrado que tanto los factores de virulencia de las bacterias invasoras como las reacciones inmunes del hospedador contribuyen al daño del tejido mamario (Zhao y Lacasse, 2008).

En el caso de las IIM por *S. aureus*, la inducción de apoptosis por este patógeno puede generar daño en el tejido mamario, comprometer la respuesta inmune antimicrobiana y de este modo facilitar la propagación del microorganismo (Genestier y col., 2005; Zhao y Lacasse, 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que *S. aureus* induce apoptosis en neutrófilos (Sladek y col., 2005; Genestier y col., 2005), linfocitos (Slama y col., 2009), macrófagos (Krzyminska y col., 2012) y CEM bovinas (Bayles y col., 1998; Hu y col., 2014).

Las variaciones en la expresión de proteínas pro y anti apoptóticas en la GM bovina no ha sido completamente explorada, al igual que el rol exacto de los genes que regulan la apoptosis durante la infección mamaria (Colitti, 2012). Además, poco se ha reportado en relación a los eventos de señalización involucrados en la apoptosis de las células mamarias *in vitro* luego de la infección con *S. aureus* (Hu y col., 2014) y existe escasa información sobre los mecanismos de muerte en GM infectadas crónicamente con *S. aureus* durante la involución activa. En este sentido, Dallard y col. (2008) en su estudio realizado en GM bovinas sanas y crónicamente infectadas con *S. aureus* tratadas con un inmunomodulador a base de LPS y placebo al final de la lactancia observaron un incremento significativo en los porcentajes de inmunomarcación para Bax a nivel de las células del parénquima y del estroma en cuartos infectados con *S. aureus* respecto a los no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución. En el presente estudio, en concordancia a lo observado por Dallard y col. (2008) se observó un efecto significativo de la IIM por *S. aureus* sobre los porcentajes de inmunomarcación para Bax y Bcl-2 en todos los periodos de la involución evaluados. En el caso de Bax, no se detectó un efecto del tiempo de muestreo, observándose porcentajes de marcación significativamente superiores en cuartos infectados con respecto a sanos en todos los tiempos de la involución evaluados con porcentajes de marcación similares entre periodos de muestreo. Para Bcl-2, los porcentajes de inmunomarcación fueron significativamente mayores en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados, observándose al día 21 la mayor expresión proteica. Los resultados obtenidos para Bcl-2 y Bax, en asociación con los reportados en otros estudios, indican una sobre expresión de ambas proteínas durante la involución activa de la GM bovina en cuartos con infecciones crónicas por *S. aureus* respecto a

cuartos no infectados, sugiriendo por un lado, un aumento de la muerte celular por apoptosis, evaluado mediante el incremento de la proteína proapoptótica Bax, así como una inhibición de la apoptosis evaluado mediante el incremento progresivo de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Este hallazgo podría indicar un intento de contrarrestar los efectos de la reacción inflamatoria inducida por la IIM para mantener la integridad del tejido afectado.

Otro de los elementos evaluados en este estudio fue el receptor Fas, también conocido como APO-1 o CD95, el cual es miembro de la superfamilia del receptor de TNF y es capaz de mediar la muerte celular por apoptosis en varios tipos celulares (Kikuchi y col., 2014). En estudios previos llevados a cabo en GM sanas en ratones (Song y col., 2000), demostraron un aumento en los niveles de expresión génica y proteica para Fas y Fas ligando (FasL) luego del destete, lo cual coincidió con la aparición de células apoptóticas en ductos mamarios, sugiriendo que la interacción Fas-FasL juega un rol importante en la remodelación normal del tejido mamario en ratones. En el presente estudio, la inmunomarcación de Fas se visualizó a nivel citoplasmático en células del parénquima y en menor medida del estroma tanto en tejidos provenientes de cuartos mamarios infectados como en no infectados. El patrón de localización observado coincidió con el reportado por Song y col. (2000) en GM de ratón.

Hu y col. (2014) demostraron que *S. aureus* induce apoptosis en pBMEC a través del receptor de muerte Fas-FADD y que dicha inducción se asoció con la activación de caspasa-3 y caspasa-8, pero no de caspasa-9. Además, que la apoptosis de las células epiteliales se vio mitigada por inhibidores de caspasa-3 y caspasa-8, sugiriendo que la apoptosis se inicia a través de la activación de caspasa-8. Más aún, que la infección por *S. aureus* incrementó significativamente la expresión génica y proteica de Fas y FADD en las pBMEC, concluyendo que este patógeno induciría la apoptosis de las células epiteliales vía el receptor de muerte Fas-FADD disparando la señalización dependiente de caspasa-8 (Hu y col., 2014). De acuerdo con estos resultados en nuestro estudio observamos que la expresión de Fas fue significativamente mayor en cuartos infectados crónicamente con *S. aureus* respecto a cuartos no infectados en todos los periodos de tiempo evaluados, reforzando el concepto de que durante el periodo de

involución, la presencia de la bacteria por largos periodos en la GM está asociada a un aumento en la apoptosis de las células epiteliales y estromales, el cual podría favorecer la persistencia de *S. aureus* en la GM.

Caspasa-3 activa fue otro de los factores evaluados en el presente estudio que interviene en los mecanismos de apoptosis. La misma pertenece a una familia muy conservada de cisteínas proteasas, las cuales son mediadoras claves en el curso de la muerte celular por apoptosis (Fenwick y Hurst, 2002). Caspasa-3, -6 y -7 son efectoras de la apoptosis, mientras que caspasa-2, -8, -9 y -10 pertenecen al grupo de proteasas iniciadoras de la apoptosis (Friedlander, 2003). Caspasa-3 puede ser activada durante el proceso apoptótico y a su vez activar endonucleasas que causan la aparición de las características morfológicas de las células apoptóticas (Van Cruchten y col., 2003). La expresión y activación de caspasa-3 desencadena la apoptosis en diferentes tipos celulares (Earnshaw y col., 1999). Además, se ha determinado que la activación de la cascada de las caspasas dispara la apoptosis en ciertos tipos de células infectadas con bacterias (Jin y col., 2009; Krzyminska y col., 2012).

Gown y Willingham (2002) demostraron que la activación de las caspasas (clivaje de procaspasa a caspasa activa) es un sello característico de casi todos los sistemas apoptóticos. En este aspecto, caspasa-3 sería un efector central en muchas células y mediaría el clivaje de ella misma, de otras caspasas de la cascada y de otros sustratos de caspasas. Como se ha mencionado anteriormente Hu y col. (2014), observaron en pBMEC que *S. aureus* induce la apoptosis a través de una vía mediada por receptores que conduce a la activación de las caspasas-3 y -8. Estos resultados coinciden con los de un estudio previo en una línea de células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T), en el cual se observó que la infección con *S. aureus* indujo también la activación de estas caspasas (Wesson y col., 2000).

En este estudio, los porcentajes de inmunomarcación para caspasa-3 activa fueron mayores en cuartos infectados crónicos por *S. aureus* respecto a cuartos no infectados en los tres periodos de la involución evaluados, observándose en cuartos infectados la mayor expresión proteica al día 21 de la involución. Estos resultados coinciden con los reportados por Dallard y col. (2008), quienes encontraron un incremento en la inmunomarcación de caspasa-3 activa tanto en la zona del estroma

como del parénquima mamario en cuartos infectados crónicos con *S. aureus* respecto a sanos durante la involución activa. Estos resultados, sumados a los de estudios previos, sugieren que tanto *in vitro* como *in vivo*, la presencia de *S. aureus* induce un aumento en la expresión así como en la activación de caspasas, entre ellas la caspasa-3 evaluada en este estudio, la cual participa en la cascada que conduce a la muerte celular por apoptosis, reforzando el concepto de que la presencia de la bacteria por largos periodos en la GM está asociada a un aumento en la apoptosis de las células epiteliales y estromales.

En relación a la cuantificación de las células apoptóticas por la técnica de TUNEL, los porcentajes fueron mayores en GM infectadas crónicamente con *S. aureus* respecto a no infectadas, tanto en células epiteliales como estromales, observándose un efecto significativo del tiempo y del estado infeccioso. En células epiteliales, sólo se observó un incremento significativo en los porcentajes de apoptosis en cuartos infectados respecto a no infectados al día 21 de la involución, mientras que en células del estroma los porcentajes de apoptosis fueron mayores en infectados respecto a no infectados en todos los periodos evaluados. Dallard y col. (2008) observaron resultados similares en GM infectadas con *S. aureus* durante la involución utilizando el mismo sistema de detección de apoptosis *in situ*. Estos autores detectaron un incremento en los porcentajes de apoptosis en cuartos infectados con respecto a no infectados a los 7 y 21 días de la involución en células epiteliales y a los 7, 14 y 21 días de la involución en células estromales. Los resultados obtenidos aportan evidencia sobre un aumento en la actividad apoptótica en el tejido mamario en respuesta a la infección crónica por *S. aureus*, especialmente con el avance del periodo de involución, en coincidencia con los demás factores evaluados en este trabajo, reforzando nuevamente la idea de que un incremento en la apoptosis de las células epiteliales y estromales podría favorecer la persistencia de *S. aureus* en la GM.

Durante la remodelación de la GM ocurre un equilibrio dinámico entre procesos de mitosis y apoptosis. Estudios previos han cuantificado la renovación celular en GM no infectadas durante la involución (Capuco y col., 2002; Sorensen y col., 2006; Norgaard y col., 2008; Dallard y col., 2011) y en GM infectadas con *S. aureus*, utilizando diferentes marcadores (Dallard y col., 2007; 2008) de proliferación celular *in situ*.

En el presente estudio, la evaluación de la proliferación celular se realizó a través de la inmunomarcación de dos antígenos nucleares de proliferación celular, PCNA y Ki-67 observándose discrepancia en los resultados entre los dos marcadores. Para PCNA, los porcentajes de células inmunopositivas fueron mayores en parénquima de cuartos infectados crónicos en los tres tiempos evaluados con un máximo al día 21, existiendo un efecto significativo del estado infeccioso y del tiempo. Por otro lado, en el estroma no existió efecto significativo ni de la infección ni del tiempo de muestreo. Para, Ki-67, los porcentajes de células del estroma y parénquima mamario inmunopositivas fueron mayores en cuartos infectados crónicos con respecto a no infectados en todos los periodos de la involución evaluados, con un efecto significativo del estado infeccioso, pero no del tiempo de muestreo. En cuartos infectados crónicos, los mayores porcentajes de proliferación en células del parénquima se observaron al día 14, mientras que en células del estroma los mayores porcentajes se registraron al día 7, disminuyendo gradualmente hacia el final de la involución. Las diferencias observadas con ambos marcadores podrían relacionarse con el tiempo de vida media de ambos antígenos de proliferación. PCNA al estar asociado a los mecanismos de reparación del daño del ADN presenta una vida media muy prolongada, mayor a 20 hs, por lo cual células que están en reposo pueden marcarse induciendo a mayor probabilidad de error en la interpretación de la marca (Lörh y col., 1997). En cambio Ki-67 se expresa 24-36 hs después de iniciada la G₁ del ciclo celular, durante la interfase y adquiere su máxima expresión durante la mitosis (du Manoir et al. 1991), presentando una vida media corta (<1 hora), lo que hace que la marcación con anti Ki-67 sólo identifique células en proliferación y no en reposo. En concordancia con los resultados obtenidos en este estudio, Dallard y col. (2007, 2008), demostraron que la proliferación celular, determinada por la inmunomarcación de PCNA y Ki-67, se vio incrementada en células epiteliales y estromales en cuartos infectados crónicamente con *S. aureus*, comparados con cuartos no infectados, durante la involución temprana de la GM bovina. En este estudio, en asociación con los incrementos en la proliferación celular, también se observó un aumento significativo en la expresión proteica de los componentes de la familia de TGF- β en cuartos con infección crónica por *S. aureus*. Estos hallazgos, en su conjunto, podrían representar un

mecanismo para contrarrestar y disminuir el daño tisular ocasionado por la reacción inflamatoria y contribuir a la reparación celular.

Con el propósito de evaluar el efecto de la IIM por *S. aureus* sobre el balance proliferación/apoptosis, en este estudio, se evaluó la relación Ki-67/TUNEL tanto en células del parénquima como del estroma en los diferentes tiempos de la involución estudiados. Si bien no se observó un efecto significativo de la IIM sobre el balance proliferación/apoptosis, tanto en células del parénquima como del estroma, este balance fue significativamente mayor en cuartos infectados por *S. aureus* respecto a sanos al día 14 de involución, no observándose diferencias en los demás periodos evaluados. Estos resultados muestran que si bien ambos procesos, tanto proliferación como apoptosis, se vieron incrementados durante la involución de la GM en presencia de una infección crónica por *S. aureus*, al día 14 de la involución los porcentajes de proliferación fueron significativamente superiores en cuartos infectados lo que sugiere una intenso recambio celular en un intento de subsanar el daño tisular ocasionado por la infección crónica. Además, esta etapa (14 días post secado) coincide con el periodo de máxima remodelación observada en el parénquima y estroma mamarios, tal como se reportó en estudios previos en GM sanas (Holst y col., 1987; Sordillo y Nickerson, 1988; Capuco y col., 1997) y en GM infectadas por *S. aureus* (Dallard y col., 2008). En los estudios de Dallard y col. (2008) estos autores evaluaron la relación inversa, es decir apoptosis/proliferación, en GM infectadas con *S. aureus* y no infectadas durante la involución, observando que en células del parénquima la relación apoptosis/proliferación fue mayor en cuartos sanos con respecto a infectados a los 7 y 14 días de la involución, mientras que en células del parénquima la relación apoptosis/proliferación fue superior en cuartos sanos respecto a infectados durante toda la involución. Estos resultados, al igual que los observados en el presente trabajo, demuestran el intenso recambio celular en GM crónicamente infectadas con *S. aureus* durante la involución.

Objetivo específico Nro. 5: “Investigar in vitro los cambios en la capacidad fagocítica de macrófagos colectados a partir de secreciones mamarias provenientes de cuartos sanos y de cuartos con infecciones crónicas por S. aureus en diferentes estadios de la involución”.

6.5. Capacidad fagocítica de macrófagos

A los fines de evaluar variaciones en la capacidad fagocítica de macrófagos de leche proveniente de GM infectadas crónicamente con *S. aureus* en comparación con la capacidad fagocítica de macrófagos provenientes de GM sanas durante la involución, se realizaron ensayos *in vitro* enfrentando dichas células con una suspensión de *S. aureus* (cepa Reynolds) marcada con FITC, posterior tinción con bromuro de etidio y análisis por citometría de flujo del porcentaje de macrófagos capaces de fagocitar al menos una bacteria.

Estudios previos han evaluado la capacidad fagocítica de neutrófilos y macrófagos provenientes de leche de GM con mastitis y de leche de GM sanas en diferentes periodos de la lactancia y la involución, intentando dilucidar si la misma se ve afectada tanto por la infección como por el estado fisiológico de la GM (Fox y col., 1988; Niemialtowski y col., 1988; Paape y Miller, 1992; Mehrzad y col., 2009; Swain y col., 2014). Sin embargo, no se han reportado estudios que evalúen y comparen la capacidad fagocítica de macrófagos provenientes de secreciones mamarias de cuartos infectados con *S. aureus* con la de macrófagos provenientes de cuartos no infectados durante la involución activa de la GM bovina.

Los primeros estudios que se registran en la bibliografía sobre capacidad fagocítica de los leucocitos de leche de bovinos con mastitis, demostraron que la pre incubación de leucocitos obtenidos en la mitad de la lactancia a partir de leche normal con suero de leche proveniente de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* resultó en una disminución de la capacidad fagocítica de los leucocitos (Niemialtowski y col. 1988). Estos autores concluyeron que durante las mastitis crónicas por *S. aureus*, receptores Fc (FcR) de los leucocitos de la leche podrían ser bloqueados por complejos inmunes presentes en la fracción del suero de la leche mastítica asociados a un daño en la función fagocítica. Por su parte, Fox y McDonald

(1988) estudiaron a partir de leche de cuartos mamarios infectados con *S. aureus* y de cuartos libres de IIM en diferentes periodos de la lactancia, el porcentaje de neutrófilos que fagocitaron bacterias, el número de *S. aureus* en el interior de los neutrófilos y el número de *S. aureus* viable en el interior de los fagocitos. Estos autores no observaron diferencias entre los neutrófilos de leche proveniente de cuartos infectados con respecto a no infectados para ninguno de los parámetros evaluados, lo que podría indicar que las funciones de estas células son similares en las dos condiciones estudiadas.

Trabajos más recientes como el de Swain y col. (2014) evaluaron la capacidad fagocítica de neutrófilos provenientes de leche de cuartos mamarios con IIM clínicas, subclínicas y libres de IIM en diferentes periodos de la lactancia. Estos autores observaron que la actividad fagocítica fue mayor en neutrófilos de leche con mastitis subclínica y clínica comparada con la de los neutrófilos de cuartos libres de infección. Se ha demostrado que durante la invasión bacteriana en la GM, los neutrófilos de la leche muestran mayor actividad fagocítica en comparación con los neutrófilos de la sangre dado por la liberación de citoquinas inducidas por el patógeno en el sitio de infección (Alluwaimi, 2004), lo cual podría explicar las diferencias observadas en la actividad fagocítica de los neutrófilos entre GM con mastitis subclínica y clínica y controles en el estudio de Swain y col. (2014)

Si bien los resultados obtenidos por Swain y col. (2014) corresponden a otro tipo de fagocito presente en la leche en alto número en las IIM por *S. aureus*, los mismos se condicen con los obtenidos en el presente estudio a partir de macrófagos de secreción mamaria. La elección de los macrófagos para la realización de los ensayos de fagocitosis en este trabajo, se basó en que estas células constituyen el tipo celular predominante en leche y secreción de secado, y son las primeras células inmunes que interaccionan con las bacterias invasoras (Rainard y Riollot, 2006); además expresan receptores para IgG1 e IgG2, son fagocitos activos y están involucrados en la presentación de antígenos en asociación con moléculas clase I y II del CMH (Sordillo y Streicher, 2002; Rainard y Riollot, 2006). En relación a los resultados de los ensayos de fagocitosis, en el presente trabajo, se registró un aumento significativo en los porcentajes de macrófagos positivos para FITC y en el número de bacterias fagocitadas

por célula (evaluado por el parámetro de IFM) en secreciones mamarias provenientes de cuartos infectados con *S. aureus* en comparación con los no infectados. El IFM evaluado en el presente estudio, es un estimador indirecto de la capacidad fagocítica, indicando que la misma está aumentada en los macrófagos provenientes de cuartos infectados con respecto a no infectados. Si bien los resultados son relevantes ya que no existen antecedentes en la bibliografía sobre ensayos de fagocitosis a partir de macrófagos de secreción de secado en GM con IIM crónicas por *S. aureus*, se necesitan futuros estudios que evalúen si estos macrófagos con actividad fagocítica aumentada, presentan capacidad de desarrollar una actividad microbicida óptima que les permita eliminar al patógeno.

Al día 7 de la involución, si bien los porcentajes de macrófagos positivos fueron similares entre infectados y no infectados, la capacidad fagocítica de estas células fue significativamente mayor en infectados. Al día 14 ambos parámetros evaluados (porcentajes de macrófagos positivos y capacidad fagocítica) se vieron significativamente aumentados en macrófagos provenientes de cuartos infectados en relación a no infectados, lo que indica una mayor capacidad para ingerir bacterias y un mayor estado de activación de los fagocitos en este periodo de la involución. Asimismo, en relación a este resultado, en tejido mamario se observó una disminución en el número de monocitos-macrófagos en cuartos infectados en comparación con no infectados al día 14 de la involución, lo que podría sugerir una migración y extravasación de macrófagos hacia la secreción mamaria en este periodo donde esta célula mostró su mayor capacidad fagocítica. Más aún, la disminución observada en el número de macrófagos tisulares en cuartos infectados en este periodo, estuvo acompañada por elevados porcentajes de marcación en los tejidos y elevadas concentraciones en secreción mamaria de citoquinas pro inflamatorias como TNF- α , IL-1 α , IL- β e IL-6, lo que indica un microambiente óptimo para la estimulación de las células fagocíticas. Por otra parte, al día 21 la menor capacidad fagocítica observada en macrófagos de cuartos infectados con respecto a no infectados fue compensada por los mayores porcentajes de macrófagos positivos provenientes de cuartos infectados. En resumen, si bien se observaron variaciones en cada periodo de estudio, se puede afirmar que durante todo el proceso de involución, el número de macrófagos positivos así

como la capacidad fagocítica fueron mayores en fagocitos aislados de secreciones de cuartos infectados en relación a no infectados. Estos resultados sugieren que la persistencia de *S. aureus* en la GM durante el periodo de involución, podría relacionarse con la sobrevivencia del organismo en los macrófagos de la leche y la potencial replicación en estas células, aunque se necesitarían estudios complementarios que evalúen la habilidad de multiplicación de la bacteria en el fagocito así como la capacidad bactericida de los macrófagos infectados.

Denis y col. (2006) compararon la capacidad de macrófagos obtenidos a partir de leche en la lactancia media y de secreción mamaria en la mitad del secado para fagocitar y destruir *S. uberis*. Estos autores observaron que los macrófagos provenientes de secreciones de secado mostraron mayor actividad bactericida que los obtenidos de leche, destacando la importancia de los diferentes estadios del ciclo de lactación en la funcionalidad de los macrófagos en las secreciones mamarias. Por otra parte, Fox y col. (1988), demostraron un incremento en la fagocitosis de *S. aureus* por parte de macrófagos provenientes de secreciones mamarias de animales no infectados al día 14 de la involución con respecto al día 7. En nuestro estudio, en macrófagos provenientes de secreciones mamarias de cuartos no infectados, si bien se observó un incremento en los porcentajes de macrófagos positivos con el progreso de la involución, no se observaron diferencias significativas entre los tres periodos evaluados. Sin embargo, sí se observó un aumento significativo en la capacidad fagocítica de los macrófagos provenientes de secreciones de cuartos no infectados al día 14 y 21 en relación al día 7 de la involución, lo cual avala lo observado por Fox y col. (1988).

Por otra parte, Tatarczuch y col. (2002) en un ensayo con ovejas, evaluaron la capacidad fagocítica de leucocitos provenientes de secreciones mamarias obtenidas en diferentes tiempos post destete. Estos autores observaron que la actividad fagocítica de los macrófagos, evaluada mediante ensayos de fagocitosis *in vitro* basados en la ingesta de perlas de látex, fue más efectiva en los macrófagos obtenidos a partir de secreciones de GM con involución avanzada (60 días) en comparación con los obtenidos a partir de secreciones en estadios más tempranos de la involución (7 a 15 días). Asimismo, observaron que la capacidad fagocítica se vio influenciada por la

presencia dentro de los fagocitos de constituyentes de la leche, observando que los macrófagos obtenidos de GM con involución avanzada fueron más efectivos fagocitando, en comparación con los macrófagos de estadios más tempranos. Si bien en el presente estudio los ensayos de fagocitosis se realizaron con *S. aureus*, se condicen con los resultados obtenidos en otra especie por Tatarczuch y col. (2002) en secreciones mamarias libres de infección.

7- Conclusión

En el presente trabajo se evaluaron diferentes componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa, así como parámetros relacionados con la remodelación del tejido en cuartos mamarios con infecciones crónicas por *S. aureus* y en cuartos no infectados después del cese del ordeño, durante la involución activa, etapa que se caracteriza por cambios profundos en la estructura y función de la GM bovina.

Todos los componentes de la respuesta inmune evaluados (citoquinas pro y anti-inflamatorias, células, factores solubles) así como los parámetros relacionados con la remodelación del tejido mamario (componentes de la subfamilia TGF- β , colágeno I, proteínas relacionadas con la apoptosis, antígenos nucleares relacionados con la proliferación celular) fueron detectados y cuantificados tanto en tejidos mamarios de cuartos sanos como en tejidos de cuartos infectados con *S. aureus* durante toda la involución, lo que sugiere que estos componentes del sistema inmune tienen una participación preponderante en esta etapa, en la cual se producen cambios profundos en la arquitectura histológica y en la función de la GM bovina. En cuartos mamarios con infecciones crónicas por *S. aureus* los componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa evaluados, en general, se vieron significativamente aumentados en relación a lo observado en cuartos mamarios no infectados, detectándose variaciones en los diferentes periodos de la involución analizados. En cuanto a los componentes relacionados con los procesos de remodelación de la GM, se observó una mayor expresión de los miembros de la subfamilia de TGF- β y de colágeno I en cuartos mamarios infectados con respecto a no infectados. En lo referido a los mecanismos de proliferación y apoptosis involucrados en la remodelación, en general, se observó un incremento de ambos mecanismos en los cuartos infectados por *S. aureus* respecto a los cuartos libres de infección.

Todos estos resultados en su conjunto sugieren una respuesta exacerbada y sostenida del sistema inmune del hospedador frente a la presencia por largos periodos de la bacteria, así como una intensa remodelación del tejido en respuesta al daño ocasionado por la reacción inflamatoria que intenta limitar la infección y trae como consecuencia una remodelación aberrante de la GM con incremento del área estromal y fibrosis que irremediablemente lleva a una disminución del tejido secretor. Como

consecuencia, *S. aureus* logra evadir los mecanismos de defensa del hospedador y persistir en la GM durante todo el proceso de involución activa.

Finalmente, el presente trabajo ha sido de utilidad para conocer más acerca de los mecanismos implicados en la respuesta inmune de la GM sana e infectada crónicamente por *S. aureus*, lo cual conduce a un mejor entendimiento acerca de los factores que regulan el reclutamiento, retención y eliminación de las células del sistema inmune en la GM durante la involución activa, aportando nueva información sobre los mecanismos asociados al mantenimiento de la cronicidad del proceso infeccioso durante la involución mamaria.

8- Bibliografía

- Abrahmsén M, Persson Y, Kanyima BM, Båge R. 2014. Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod.* 46:99-105.
- Agace W, Hedges S, Andersson U, Andersson J, Ceska M, Svanborg, C. 1993. Selective Cytokine Production by Epithelial Cells following Exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 61:602-609.
- Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16:291-304.
- Akers RM. 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 89:1222-1234.
- Akers RM, Nickerson SC. 2011. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 6:275-289.
- Akineden O, Annemüller C, Hassan AA, Lämmle C, Wolter W, Zschöck M. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8:959-964.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124:783-801.
- Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS. 2003. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50:105-11.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry J, Oliver SP. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 79:1021-1026.
- Almeida RA, Oliver SP. 1993. Antiphagocytic effect of the capsule of *Streptococcus uberis*. *Zentralbl Veterinarmed B.* 40:707-714.
- Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. 2012. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into

bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet Microbiol.* 155:324-331.

- Anaya JM. 2003. Descripción Molecular del TNF- α . *Reumatología* 19:112-120.
- Anderson DC, Springer TA. 1987. Leukocyte adhesion deficiency: An inherited defect in the MAC-1, LFA-1 and p150, 95 glycoproteins. *Annu Rev Med.* 38:175.
- Anderson JC. 1983. Veterinary aspects of staphylococci, in *Staphylococci and Staphylococcal infections*, A.C. Easmon C.S.F., Editor. Academic Press: London-New York. 193-241.
- Andres AC, Strange R. 1999. Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 4:221-228.
- Annen EL, Fitzgerald AC, Gentry PC, McGuire MA, Capuco AV, Baumgard LH, Collier RJ. 2007. Effect of continuous milking and bovine somatotropin supplementation on mammary epithelial cell turnover. *J Dairy Sci.* 90:165-183.
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. 2003. Interleukin-10 therapy-Review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 55:241-269.
- Asai K, Kai K, Rikiishi H, Sugawara S, Maruyama Y, Yamaguchi T, Ohta M, Kumagai K. 1998. Variation in CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet Immunol Immunopathol.* 65:51-61.
- Ashcroft GS. 1999. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microbes and Infection.* 1:1275-1282.
- Atabai K, Sheppard D, Werb Z. 2007. Roles of the innate immune system in mammary gland remodeling during involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 12:37-45.
- Atalla H, Gyles C, Wilkie B, Leslie K, Mallard B. 2009. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. *Vet Microbiol.* 137:326-334.
- Bachman KC, Schairer ML. 2003. Invited review: bovine studies on

optimal lengths of dry periods. *J Dairy Sci.* 86:3027–3037.

- Bannerman DD. 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci.* 87:10-25.
- Bannerman DD, Paape MJ, Chockalingham A. 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor- α , β 1, and β 2. *Vet Immunol Immunopathol.* 112:309-315.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11:463-472.
- Baravalle C, Dallard BE, Cadoche MC, Pereyra EA, Neder VE, Ortega H H, Calvinho LF. 2011. Proinflammatory cytokines and CD14 expression in mammary tissue of cows following intramammary inoculation of *Panax ginseng* at drying off. *Vet Immunol Immunopathol.* 144:52-60.
- Baravalle C, Silvestrini P, Cadoche M, Beccaria C, Andreotti C, Renna M S, Pereyra EA, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE. 2015. Intramammary infusion of *Panax ginseng* extract in bovine mammary gland at cessation of milking induces changes in the expression of *toll-like* receptors, MyD88 and NF- κ B during early involution *Res Vet Sci.* 100:52–60.
- Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil J, Ote I. 2014. Associations between proprieties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 169:74-79.
- Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. 2007. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol.* 149:217-225.
- Barrio MB, Rainard P, Gilbert FB, Poutrel B. 2003. Assessment of the opsonic activity of purified bovine IgA following intramammary immunization of cows with *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 86:2884-2894.
- Bayles K, Wesson C, Liou L, Fox L, Bohach G, Trumble W. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun.* 66:336-342.

- Bedolla C, Castañeda V. 2003. Agentes patógenos causantes de la mastitis bovina. Cuatro Vientos. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 38:27-29.
- Bedolla C, Ponce De León M. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. Red Vet. 9:2-26.
- Bonetto CC. 2014. Mastitis bovina causada por *Staphylococcus coagulasa* negativos. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Bougarn S, Cunha P, Gilbert FB, Harmache A, Foucras G, Rainard P. 2011. Staphylococcal-associated molecular patterns enhance expression of immune defense genes induced by IL-17 in mammary epithelial cells. Cytokine 56:749-759.
- Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. 2007. Survey of the incidence and etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet Rec. 160:253-257.
- Bragulla H, König HE, Budras KD. 2003. The Udder. En: Budras KD, Habel RE (Eds). Bovine Anatomy. 1° Ed. Germany, Schlütersche GmbH & Co. KG. p 88-89.
- Brenaut P, Lefèvre L, Rau A, Laloë D, Pisoni G, Moroni P, Bevilacqua C, Martin P. 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. Vet Res. 45:16.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 303:1532-1535.
- Burvenich C, Bannerman DD, Lippolis JD, Peelman L, Nonnecke BJ, Kehrlí ME Jr, Paape MJ. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. J Dairy Sci. 90:E39-54.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. Vet Res. 34:521-564.
- Buzás K, Megyeri K, Högye M, Csanády M, Bogáts G, Mándi Y. 2004. Comparative study of the roles of cytokines and apoptosis in dilated and hypertrophic cardiomyopathies. Eur Cytokine Netw. 15:53-59.

- Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscher LP, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvinho LF, Sordelli DO. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun*. 75: 886-891.
- Calvinho LF, Almeida R, Oliver S. 1998. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 61:93-110.
- Calvinho LF, Canavesio VR, Iguzquiza IA, Marioni I, Puricelli FG, Neder VE, Tarabla HD, Aubagna MD. 2007. Intramammary infections during the periparturient period in Argentine dairy heifers. *Rev Argent Microbiol*. 39:84-89.
- Calvinho LF, Tirante L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev. FAVE, Sección Ciencias Veterinarias*. 4:29-40.
- Campbell JJ, Botos LA, Sargeant TJ, Davidenko N, Cameron RE, Watson CJ. 2014. A 3-D *in vitro* co-culture model of mammary gland involution. *Integr Biol (Camb)*. 6:618-626.
- Capuco AV, Akers RM. 1999. Mammary involution in dairy animals. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4:137-144.
- Capuco AV, Akers RM, Smith JJ. 1997. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acid and histology. *J Dairy Sci*. 80:477-487.
- Capuco AV, Ellis SE. 2005. Bovine mammary progenitor cells: current concepts and future directions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 10:5-15.
- Capuco AV, Li M, Long E, Ren S, Hruska KS, Schorr K, Furth PA. 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.
- Castro F, Rojas P, Rodríguez L. 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. *Rev Agro-Ciencia*. 22:49-58.
- Cermakova J, Kudrna V, Simeckova M, Vyborna A, Dolezal P, Illek J. 2014. Comparison of shortened and conventional dry period management strategies. *J Dairy Sci*. 97:5623-5636.

- Chaneton L, Tirante L, Maito J, Chaves J, Bussmann LE. 2008. Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 91:1865-1873.
- Chockalingam A, Paape MJ, Bannerman DD. 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.
- Chu PG, Chang KL, Arber DA, Weiss LM. 1999. Practical applications of immunohistochemistry in hematolymphoid neoplasms. *Ann Diag Pathol.* 3:104-133.
- Cluitmans FHM, Esendam BHJ, Landegent JE, Willemze R, Falkenburg JHF. 2005. IL-4 down-regulates IL-2-, IL-3-, and GM-CSF-induced cytokine gene expression in peripheral blood monocytes. *Annals of hematology.* 68:293-298.
- Cohen JJ. 1993. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract.* 28:35-43.
- Colitti M. 2012. BCL-2 Family of Proteins and Mammary Cellular Fate. *Anat Histo. Embryol.* 41:237-247.
- Colitti M, Wilde CJ, Stefanon B. 1999. Functional expression of bcl-2 protein family and AIF in bovine mammary tissue in early lactation. *J Dairy Res.* 71:20-27.
- Cooray R, Björck L. 1995. Bactericidal activity of the bovine myeloperoxidase system against bacteria associated with mastitis. *Vet Microbiol.* 46:427-434.
- Corbellini CN. 1996. Actualización en la patogenia y diagnóstico de las mastitis en: *Memorias Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis, ALMAST, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.* p. 37-48.
- Cork MJ, Duff GW. 1994. Interleukin-1. En: *Epidermal Growth Factors and Cytokines.* Eds. Luger, T.A., Schwarz, T., Marcel Dekker, New York, p. 19-48.
- Cox G, Crossley J, Xing Z. 1995. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 12:232-237.
- Cua D, Tato C. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 10:479-489.

- Dallard BE, Baravalle C, Ortega H, Ruffino V, Heffel S, Calvinho LF. 2008. Effect of a biological response modifier on cellular death mechanisms at drying off. *J Dairy Res.* 75:167-175.
- Dallard BE, Baravalle C, Ortega HH, Tumini M, Canavesio VR, Neder VE, Calvinho LF. 2009. Effect of a biological response modifier on expression of CD14 receptor and tumor necrosis factor- α in *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands at drying off. *Vet Immunol Immunopathol.* 32:237-42.
- Dallard BE, Calvinho LF. 2010. Receptores Tipo "Toll" en la inmunidad innata y su rol durante la infección intramamaria por *Staphylococcus aureus*. *Revista Fave - Cs Vet.* 9:37-50.
- Dallard BE, Ortega HH, Iguzquiza IA, Salvetti NR, Quaino OA, Calvinho LF. 2010. The effect of a single intramammary infusion of a biological response modifier in cows at drying off. *Vet Res Commun* 34:519-532.
- Dallard BE, Pujato S, Baravalle C, Pereyra EAL, Rey F, Renna MS, Calvinho LF. 2013. Intramammary infusion of *Panax ginseng* extract in the bovine mammary gland at cessation of milking modifies components of the insulin-like growth factor system during involution. *Res Vet Sci.* 49:462-470.
- Dallard BE, Ruffino V, Heffel S, Calvinho LF. 2007. Effect of a biological response modifier on expression of growth factors and cellular proliferation at drying off. *J Dairy Sci.* 90:2229-2240.
- Daly AC, Randall RA, Hill CS. 2008. Transforming growth factor-b induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol.* 28:6889-6902.
- Daniel CW, Robinson S, Silberstein GB. 2001. The transforming growth factors-b in development and functional differentiation of the mouse mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* 501:61-70.
- Davis WC, Splitter GS. 1991. Individual antigens of cattle. Bovine CD2 (BoCD2). *Vet Immunol Immunopathol.* 27:43-50.
- Dellmann HD. 1994. *Histología Veterinaria. Segunda Edición.* Zaragoza, España, p.323-353.

- Denis M, Parlane NA, Lacy-Hulbert SJ, Summers EL, Buddle BM, Wedlock DN. 2006. Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 114:111-20.
- DERNFALK J, PERSSON WALLER K, JOHANNISSON A. 2007. The xMAP technique can be used for detection of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in bovine samples. *Vet Immunol Immunopathol.* 118:40-49.
- D'haeseleer M, Cocquyt G, Van Cruchten S, Simoens P, Van den Broeck W. 2006. Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Theriogenology.* 65:757-72.
- De Vlieghe S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.* 95:1025-1040.
- De Vries LD, Casey T, Dover H, VandeHaar MJ, Plaut K. 2011. Effects of transforming growth factor- β on mammary remodeling during the dry period of dairy cows. *J Dairy Sci.* 94:6036-6046.
- De Vries LD, Dover H, Casey T, VandeHaar MJ, Plaut K. 2010. Characterization of mammary stromal remodeling during the dry period. *J Dairy Sci.* 93:2433-2443.
- DIESER SA, VISSIO C, LASAGNO MC, BOGNI CI, LARRIESTRA AJ, ODIERNO LM. 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pak Vet J.* 34:124-126.
- Di Giovine FS, Duff GW. 1990. Interleukin-1: the first interleukin. *Immunol Today.* 11:151-152.
- Di Giovine FS, Symons JA, Duff GW. 1991. Kinetics of IL-1 beta mRNA and protein accumulation in human mononuclear cells. *Immunol Lett.* 29:211-218.
- Dinarello CA. 1994. The interleukin-1 family: ten years of discovery. *FASEB J.* 8:1314-1325.
- Dinarello CA, Moldawer LL. 1999. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Amgen, Thousand Oaks, CA, USA. 2971-2980.

- Djabri B, Barielle N, Beaudeau F, Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a metaanalysis. *Vet Res.* 33:335-357.
- Dos Santos J, Netto Dos Santos K, Gentiline E, Sordelli D, De Freire Bastos M. 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 85:133-144.
- Dulin AM, Paape MJ, Nickerson SC. 1988. Comparison of phagocytosis and chemiluminescence by blood and mammary gland neutrophils from multiparous and nulliparous cows. *Am J Vet Res.* 49:172-177.
- du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. 1991. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry.* 12:455-463.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68:383-424.
- Ellison RT, Giehl TJ, LaForce FM. 1988. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun.* 56:2774-2781.
- Estes DM, Closser NM, Allen GK. 1994. IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. *Cell Immunol.* 154:287-295.
- Ewan KB, Oketch-Rabah HA, Ravani SA, Shyamala G, Moses HL, Barcellos-Hoff MH. 2005. Proliferation of estrogen receptor-alpha-positive mammary epithelial cells is restrained by transforming growth factor-beta1 in adult mice. *Am J Pathol.* 167:409-417.
- Ezzat Alnakip M, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. 2014. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *J Vet Med.* 1-31.
- Faimboim L, Geffner J. 2008. Introducción a la inmunología humana. 5ta. Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, p. 51-88.
- Fargeas C, Wu CY, Nakajima T, Cox D, Nutman T, Delespesse G. 1992.

Differential effect of transforming growth factor- β on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 22, 2173–2176.

- Farrelly N, Lee YJ, Oliver J, Dive C, Streuli CH. 1999. Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. *J Cell Biol.* 144: 1337-1348.

- Federation of Animal Sciences Societies (FASS). 1999. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

- Feng XH, Derynck R. 2005. Specificity and versatility in $\text{tgf-}\beta$ signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21: 659-93.

- Fenwick MA1, Hurst PR. 2002. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction.* 124:659-665.

- Fernández Botran R, Chilton PM, Ma Y. 1996. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy. *Adv Immunol.* 63: 269-336.

- Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 73:1907-1916.

- Finlay BB, Cossart P.1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 5313:718-725.

- Flanders KC, Wakefield LM. 2009. Transforming growth factor-(β)s and mammary gland involution; functional roles and implications for cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 14:131-144.

- Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A. Graber H.U. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci.* 85: 439-448.

- Fox LK, McDonald JS. 1988. Functional activity of neutrophils from bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 71:3521-3534.

- Fox LK, McDonald JS, Hillers JK, Corbeil LB. 1988. Function of phagocytes obtained from lacteal secretions of lactating and nonlactating cows. *Am J Vet Res.* 49:678-681.

- Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT. 1999.

Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 104:271–280.

- Friedlander RM. 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med.* 348:1365-1375.
- Fry PR, Calcutt MJ, Foeking MF, Hsieh HY, Suntrup DG, Perry J, Stewart GC, Middleton JR. 2014. Draft Genome Sequence of *Staphylococcus chromogenes* Strain MU 970, Isolated from a Case of Chronic Bovine Mastitis. *Genome Announc.* 2 :1-2.
- Fu Y, Zhou E, Liu Z, Li F, Liang D, Liu B, Song X, Zhao F, Fen X, Li D, Cao Y, Zhang X, Zhang N, Yang Z. 2013. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 155:245-252.
- Gajewska M, Gajkowska B, Motyl T. 2005. Apoptosis and autophagy induced by TGF- β 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *J Physiol Pharmacol.* 56: 143–157.
- Gajewska M, Motyl T. 2004. IGF-binding proteins mediate TGF- β 1-induced apoptosis in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 139: 65–75.
- Gasque Gómez R. 2008. Enciclopedia Bovina. 2da Edición. Ed. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Capítulo 11 978-970-32-4359-4364.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119:493–501.
- Genestier AL, Michallet MC, Pré´vost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S. 2005. *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest.* 115:3117–3127.
- Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, Rupp R, Rainard P. 2013. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res.*

44:40.

- Ginjala V, Pakkanen R. 1998. Determination of transforming growth factor-b1 and insulin-like growth factor (IGF-1) in bovine colostrum samples. J Immunoassay. 19:195-207.
- Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. Clin Diagn Lab Immunol. 11:174-85.
- González C. 2013. *Staphylococcus aureus* en población pediátrica: Epidemiología molecular y factores de virulencia. Tesis de doctorado en Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología. Universidad Complutense de Madrid.p18.
- Gouon-Evans V, Rothenberg ME, Pollard JW. 2000. Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. Development. 127: 2269-2282.
- Gown AM, Willingham MC. 2002. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. J Histochem Cytochem. 50:449-54.
- Grant CF, Ali R, Povey S, Stockinger B.1996. Macrophage presentation of endogenous self-protein: the MHC class II presentation pathway is not accessible to intracellular C5 or alpha 1-antitrypsin. Cell Immunol. 167: 230-240.
- Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM. 1998. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. Lab Invest. 78:893-913.
- Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. J Immunol. 164:3713-3722.
- Grönlund U, Johannisson A, Persson Waller K. 2006. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. Res Vet Sci. 80:147-154.
- Guidry AJ, Miller RH. 1986. Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. J. Dairy Sci. 69:1799-1805.
- Günther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum

H, Seyfert HM. 2011. Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 79: 695-707.

- Hagiwara S, Kawai K, Anri A, Nagahata H. 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J Vet Med Sci.* 65:319-23.

- Hagiwara K, Yamanaka H, Hisaeda K, Taharaguchi S, Kirisawa R, Iwai H. 2001. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Vet Res Commun.* 25:99-08.

- Halasa T, Osterås O, Hogeveen H, van Werven T, Nielen M. 2009. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *J Dairy Sci.* 92:3134-3149.

- Harmon RJ, Schanbacher FL, Ferguson LC, Smith KL. 1976. Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, and alpha-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. *Infect Immun.* 13:533-542.

- Haveri M, Hovinen M, Roslöf A, Pyörälä S. 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J Clin Microbiol.* 46:3728-3735.

- Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä, S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol.* 103:993-1000.

- Haveri MTS, Vuopio-Varkila J, Salmenlinna S, Pyörälä S. 2005. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection. *J Clin Microbiol.* 43:959-961.

- Heald CW. 1979. Morphometric study of experimentally induced *Staphylococcus bovis* mastitis in the cow. *Am J Vet Res.* 40: 1294-1298.

- 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.

- Hegde R, Isloor S, Prabhu KN, Shome BR, Rathnamma D, Suryanarayana

- VVS, Yatiraj S, Prasad CR, Krishnaveni N, Sundareshan S, Akhila DS, Gomes AR, Hegde NR. 2012. Incidence of subclinical mastitis and prevalence of major mastitis pathogens in organized farms and unorganized sectors. *Indian J Microbiol.* 53:315–320.
- Hebert A, Sayasith K, Sénéchal S, Dubreuil P, Lagacé J. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett.* 193:57-62.
 - Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest Prod Sci.* 64:95-106.
 - Hillerton J, Berry E. 2005. Treating mastitis in the cow a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol.* 98:250-1255.
 - Hockenbery DM. 1995. Bcl-2, a novel regulator of cell death. *Bioessays.* 17:631-638.
 - Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, Beutler B. 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature.* 433:523-527.
 - Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ. 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. *N Z Vet J.* 59:16-23.
 - Holst BD, Hurley WL, Nelson DR. 1987. Involution of the bovine mammary gland: histological and ultrastructural changes. *J Dairy Sci.* 70:935–944.
 - Holland M S, Stasko JA, Holland RE. 2007. Influence of extracellular matrix on bovine mammary gland progenitor cell growth and differentiation. *Am J Vet Res.* 68:476–482.
 - Hope JC, Whelan AO, Hewinson RG, Vordemeier M, Howard CJ. 2003. Maturation of bovine dendritic cells by lipopeptides. *Vet Immunol Immunopathol.* 95:21-31.
 - Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 168:4531–4537.

- Hu Q, Cui X, Tao L, Xiun L, Wang T, Wang X. 2014. *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in primary bovine mammary epithelial cells through Fas-FADD death receptor-linked caspase-8 signaling. *DNA Cell Biol.* 33:388–397.
- Humphreys RC. 1999. Programmed cell death in the terminal end bud. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 4:213-220.
- Hurley WL. 1989. Mammary gland function during involution. *J Dairy Sci.* 72:1637-1646.
- Hurley WL, Rejman JJ. 1993. Bovine lactoferrin in involuting mammary tissue. *Cell Biol Int.* 17:283-289.
- Huynh HK, Oger J, Dorovinizis K. 1995. Interferon- β downregulates interferon- γ -induced class II MHC molecule expression and morphological changes in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 60:63-73.
- Ibelgaufts H. 1995. Dictionary of cytokines. Ed. 5^a. New York, NY: Editorial VCH. p. 777.
- Isobe N, Nakamura J, Nakano H, Yoshimura Y. 2009. Existence of functional lingual antimicrobial peptide in bovine milk. *J Dairy Sci.* 92:2691-2695.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2001. Immunobiology: En: The immune system in health and disease. Eds: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Garland Publishing, New York, p. 635.
- Jeruss JS, Santiago JY, Woodruff TK. 2003. Localization of activin and inhibin subunits, receptors and SMADs in the mouse mammary gland. *Mol Cell Endocrinol.* 203:185–196.
- Jin Y, Cox DA, Knecht R, Raschdorf F, Cerletti N. 1991. Separation, purification, and sequence identification of TGF- β 1 and TGF- β 2 from bovine milk. *J Protein Chem.* 10:565–575.
- Kai K, Komine Y, Komine K, Asai K, Kuroishi T, Kozutsumi T, Itagaki M, Ohta M, Kumagai K. 2002. Effects of bovine lactoferrin by the intramammary infusion in cows with staphylococcal mastitis during the early non-lactating period. *J Vet Med Sci.* 64:873-878.
- Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M,

Najjuka CF, Joloba ML. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. PLoS One. 8(5):63413.

- Kauf AC, Vinyard BT, Bannerman DD. 2007. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. Res Vet Sci. 82:39-46.

- Kawai K, Hagiwara S, Anri A, Nagahata H. 1999. Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis. Vet Res Commun. 23:391-398.

- Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. Front Biosci.1: 340-357.

- Kikuchi H, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S. 2014. Down-regulation of Fas-mediated apoptosis by plasma transglutaminase factor XIII that catalyzes fetal-specific cross-link of the Fas molecule. Biochem Biophys Res Commun. 443:13-17.

- Kim Y, Atalla H, Mallard B, Robert C, Karrow N. 2011. Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. BMC Vet Res. 7:51-63.

- Kingsley DM. 1994. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. GenesDev. 8:133-146.

- Kloos WE, Schleifer K, Genus IV.1986. *Staphylococcus*, in Bergey's Manual of systematic bacteriology, M.N.S. Sneath P.H.A., Sharpe M.E., Holt J.G., Editor. Williams and Wilkins Co.: Baltimore. 1013-1035.

- Knowles, DM. 2001. Neoplastic Hematopathology. 2nd edition Hardcover. Publisher: Lippincot Wiliams & Wilkins.

- Kolek O, Gajkowska B, Godlewski MM, Motyl T. 2003. Antiproliferative and apoptotic effect of TGF- β 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicol Pharmacol. 134:417-430.

- Kolls JK, Linden A. 2004 Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity. 21:467-476.

- Kolls JK, McCray PB Jr, Chan YR. 2008. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. Nat Rev Immunol. 8:829-835.

- Korhonen H, Marnila P, Gill HS. 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr.* 84:75–80.
- Krzymińska S, Szczuka E, Kaznowski A. 2012. *Staphylococcus haemolyticus* strains target mitochondria and induce caspase-dependent apoptosis of macrophages. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 102:611-620.
- Kuhn MT, Hutchinson JL, Norman HD. 2005. Minimum days dry to maximize milk yield in subsequent lactation. *Anim Res.* 54:351-367.
- Kulik G, Klippel A, Weber MJ. 1997. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol.* 17:1595-1606.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 680-5.
- Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollet C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 2007. *Cytokine.* 38:12–21.
- Landmann R, Ludwig C, Obrist R, Obrecht JP. 1991. Effect of cytokines and lipopolysaccharide on CD14 antigen expression in human monocytes and macrophages. *J Cell Biochem.* 47:317-325.
- Lara-Zárate L, Lopez-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. 2011. *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 51:313-318.
- Lee CS, McCauley I, Hartmann PE. 1983. Light and electron microscopy of cells in pig colostrum, milk and involution secretion. *Acta Anat.* 116:126-135.
- Lee CS, Outteridge PM. 1981. Leucocytes of sheep colostrum, milk and involution secretion, with particular reference to ultrastructure and lymphocyte sub-populations. *J Dairy Res.* 48:225-237.
- Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellingsworth LR, Kincade PW. 1989. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *J Immunol.* 142:3875-3883.
- Lee JW, Bannerman DD, Paape MJ, Huang MK, Zhao X. 2006. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary

infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. Vet Res. 37:219-229.

- Lee JW, Paape MJ, Elsasser TH, Zhao X. 2003. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. J Dairy Sci. 86:2382-2389.

- Lee NY, Kawai K, Nakamura I, Tanaka T, Kumura H, Shimazaki K. 2004. Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. J Vet Med Sci. 66:1267-1269.

- Leitner G, Eligulashvily R, Krifucks O, Perl S, Saran A. 2003. Immune Cell Differentiation in Mammary Gland Tissues and Milk of Cows Chronically Infected with *Staphylococcus aureus*. J Vet Med. 50:45-52.

- Leitner G, Shoshani E, Krifucks O, Chaffer M, Saran A. 2000. Milk leukocyte population patterns in bovine udder infection of different etiology. J Vet Med Ser B. 47:581-589.

- Le Maréchal C, S.N., Jardin J, Hernandez D, Jan G, Rault L, Azevedo V, François P, Schrenzel J, van de Guchte M, Even S, Berkova N, Thiéry R, Fitzgerald JR, Vautor E, Le Loir Y. 2011. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. PLoS One. 6:27354.

- Letterio JJ, Roberts AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF- β . Annu Rev Immunol. 16:137-161.

- Lin Y, Xia L, Turner JD, Zhao X. 1995. Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium *in vitro*. Am J Vet Res. 56:203-207.

- Lippolis JD, Reinhardt TA, Goff JP, Horst RL. 2006. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. Vet Immunol Immunopathol. 113:248-255.

- Liuzzi GM, Latronico T, Fasano A, Carlone G, Riccio P. 2004. Interferon- β inhibits the expression of metalloproteinases in rat glial cell cultures: implications for multiple sclerosis pathogenesis and treatment. Mult Scler. 10:290-297.

- Lohr CV, Teifke JP, Failing K, Weiss E. 1997. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method

with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet Pathol.* 34:212-221

- Majno G1, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146:3-15.
- Maliszewski CD, Wright SD. 1991. CD14 and immune response to lipopolysaccharide. *Science.* 252:1321-1322.
- Manickam R, Pena RN, Whitelaw CB. 2008. Mammary gland differentiation inversely correlates with GDF-8 expression. *Mol Reprod Develop.* 75: 1783–1788.
- Massagué J, Gomis RR. 2006. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 580:2811-2820.
- Matsuzaki G, Umemura M. 2007. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol.* 51:1139-1147.
- Meglia G. 2007. ¿Por qué las infecciones son más frecuentes al parto? ¿Cuál es su relación con la nutrición de la vaca lecheras? Jornada APROCAL - INTA Rafaela.
- Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. 2005. High milk neutrophil hemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Vet Res.* 36:101-116.
- Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. 2009. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation. *Vet Microbiol.* 134:106-112.
- Mehrzad J, Janssen D, Duchateau L, Burvenich C. 2008. Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8+ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 91:193-201.
- Melchior MB, van Osch MH, Lam TJ, Vernooij JC, Gaastra W, Fink-Gremmels J. 2011. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J Dairy Sci.* 94:5926-5937.
- Menzies P, Ramanoon S. 2001. Mastitis of sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 17:333-358.

- MinAgri. 2013. Subsecretaría de Lechería Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Precio promedio de la leche cruda informado por la industria. Diciembre 2013.
http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/06_precio%20al%20productor/_archivos/060000_Precio_Productor_2013.pdf
- Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. 2004. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: Putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:61-76.
- Monks J, Geske JF, Lehman L, Fadok VA. 2002. Do Inflammatory Cells Participate in Mammary Gland Involution? *J Mammary Gland Biol.* 7:163-175.
- Motyl T, Gajkowska B, Płoszaj T, Wareski P, Skierski J, Zimowska W. 2000. Expression and subcellular redistribution of Bax during TGF-beta1-induced programmed cell death of HC11 mouse mammary epithelial cells. *Cell Mol Biol.* 46:175-185.
- 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.* 128:635-646.
- Muniain S, Plaut K. 1996. Developmental regulation of transforming growth factor-b1 receptors in mouse mammary tissue. *FASEB J.* 10:A757.
- Musters S, Coughlan K, McFadden T, Maple R, Mulvey T, Plaut K. 2004. Exogenous TGF-β1 promotes stromal development in the heifer mammary gland. *J Dairy Sci.* 87:896-904.
- Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M. 2005. *Microbiología Médica.* Elsevier Inc. Madrid. 3:11-24.
- Nagahata H, Kawai H, Higuchi H, Kawai K, Yayou K, Chang CJ. 2011. Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Vet Medical Sci.* 73:885-894.
- Nash D, Rogers G, Cooper J, Hargrove G, Keown J. 2003. Heritability of intramammary infections at first parturition and relationships with sire transmitting

abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. J Dairy Sci. 86:2684-2695.

- National Mastitis Council. 1996. Current Concepts in Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Madison, Wisconsin, EE.UU.
- Neder V, Signorini M, Cuatrin A, Gianre V, Calvinho LF. 2014. Prevalencia de bacterias patógenas de mastitis bovina en leche de tanque de frío y evaluación de medios de cultivo para el recuento y la identificación de *Staphylococcus aureus*. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias. 13:1-2.
- Newman KA, Rajala-Schultz PJ, Lakritz J, DeGraves FJ. 2009. Lactoferrin concentrations in bovine milk prior to dry-off. J Dairy Res. 76:426-32.
- Ngyen AV, Pollard JW. 2000. Transforming growth factor beta3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. Development. 127:3107-3118.
- Nickerson SC, Heald CW. 1981. Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. Am J Vet Res. 42:1351-1355.
- Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL and Boddie NT. 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 SC, Sordillo LM. 1985. Role of macrophages and multinucleate giant cells in the resorption of corpora amylacea in the involuting bovine mammary gland. Cell Tissue Res. 1985. 240:397-401.
- Niemialtowski M, Nonnecke BJ, Targowski SP. 1988. Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis. J Dairy Sci. 71:780-787.
- Norgaard JV, Theil PK, Sørensen MT, Sejrsen K. 2008. Cellular mechanisms in regulating mammary cell turnover during lactation and dry period in dairy cows. J Dairy Sci. 91:2319-2327.
- Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamatsu Y, Hanazawa S, Kitano S, Hasegawa K. 1997. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. J Periodontal Res. 32:559-569.

- Oliver SP. 1988. Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period. *Am J Vet Res.* 49:1789-1793.
- Oliver SP, Gonzalez RN, Hogan JS, Jayarao BM, Owens WE. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality, 4th edition. National Mastitis Council, Verona, WI, USA.
- Oliver SP, Sordillo LM. 1988. Udder health in the periparturient period. *J Dairy Sci.* 71:2584-2606.
- Onishi RM, Gaffen SL. 2010. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology.* 129:311-21.
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect.* 54:399-409.
- Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res.* 34:597-627.
- Paape MJ, Guidry AJ. 1969. Effect of milking on leucocytes in the subcutaneous abdominal vein of the cow. *J Dairy Sci.* 52:998-1002.
- Paape MJ, Lilius E, Wiitanen P, Kontio M, Miller RH. 1996. Intramammary defense against infectious induced by *Escherichia coli* in cows. *Am J Vet Res.* 57:477-482.
- Paape MJ, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7:109-121.
- Paape MJ, Miller RH, Young MD, Peters RR. 1992. Influence of involution on intramammary phagocytic defense mechanisms. *J Dairy Sci.* 75:1849-1856.
- Paape MJ, Shafer-Weaver K, Capuco AV, Van Oostveldt K and Burvenich C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv Exp Med Biol.* 480:259-277.

- Park J, Fox L, Seo k, McGuire M, Park Y, Rurangirwa F, Sicho W, Bohach GA. 2011. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections Vet Microbiol. 147:142-148.
- Park H, Li Z, Yang X, Chang S, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nature Immunol. 6:1133-1141.
- Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. 1993. Suppression of proliferative responses of BoCD4⁺ T lymphocytes by activated BoCD8⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. Vet Immunol Immunopathol. 36:137-151.
- Persson K, Colditz IG, Flapper P, Franklin NAF, Seow HF. 1996. Cytokine-induced inflammation in the ovine teat and udder. Vet Immunol Immunopathol. 53:73-85.
- Persson Waller K, Colditz IG, Lun S, Östensson, K. 2003. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. Res Vet Sci. 74:31-36.
- Petzl W, Zerbe H, Günther J, Yang W, Seyfert HM, Nürnberg G, Schuberth HJ. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. Vet Res. 39:18.
- Philpot WN, Nickerson SN. 1992. Mastitis: el contra ataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Estados Unidos: Babson Bros Co. 147-234.
- Philpot WN, Nickerson SN. 2000. Importancia económica de la mastitis. Ganando la lucha contra la mastitis. Westfalia-Surge. Estados Unidos de América. 1:44-53.
- Phippard DJ, Weber-Hall SJ, Sharpe PT, Naylor MS, Jayatalake H, Maas R, Woo I, Roberts-Clark D, Francis-West PH, Liu YH, Maxson R, Hill RE, Dale TC. 1996. Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during foetal and postnatal mammary gland development. Development. 122:2729-2737.

- Piccinini R, Borromeo V, Zecconi A. 2010. Relationship between *Staphylococcus aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Vet Microbiol.* 145:100-105.
- Piccinini R, Tassi R, Daprà V, Pilla R, Fenner J, Carter B, Anjum MF. 2012. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J Dairy Res.* 28:1-7.
- Plath A, Einspanier R, Peters F, Sinowatz F, Schams D. 1997. Expression of transforming growth factors- α and $\beta 1$ messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation. *J Endocrinol.* 155:501-511.
- Plaut K, Dean AJ, Patnode TA, Casey TM. 2003. Effect of transforming growth factor- β on mammary development. *Journal of Dairy Science* 86: 16–27.
- Porcherie A, Gilbert FB, Germon P, Cunha P, Trotureau A, Rossignol C, Winter N, Berthon P, Rainard P. 2016. IL-17A is an important effector of the immune response of the mammary gland to *Escherichia coli* Infection. *J Immunol.* 196:803-812.
- Pullan S, Wilson J, Metcalfe A, Edwards GM, Goberdhan N, Tilly J, Hickman JA, Dive C, Streuli CH. 1996. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci.* 109:631–642.
- Pyörälä SH, Pyörälä EO. 1998. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). *J Am Vet Med Assoc.* 212:407–412.
- Rabello RF, Souza CR, Duarte RS, Lopes RS, Teixeira LM, Castro AC. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 88:3211-3219.
- Rainard P. 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet Res.* 34:647-670.
- Rainard P, Cunha P, Bougarn S, Fromageau A, Rossignol C, Florence B, Berthon P. 2013. T Helper 17-Associated Cytokines Are Produced during Antigen-Specific Inflammation in the Mammary Gland. *PLoS One.* 8:e63471.
- Rainard P, Riollet C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 37:369-400.

- Reed CJ. 1997. Cytochrome c: Can't live with it – Can't live without it. *Cell*. 91:559–562.
- Reed CJ. 2000. Mechanism of apoptosis. *Am J Pathol*. 157:1415–1430.
- Renna MS, Pereyra EA, Baravalle C, Camussone CM, Dallard BE, Marcipar IS, Calvinho LF. 2014. Functional role of antibodies generated in heifers through immunization with *Staphylococcus aureus* vaccines in invasion and phagocytosis assays. *FEMS Microbiol Lett*. 360:62-69.
- Reza G. 2000. Mastitis bovina su reconocimiento clínico, programas de prevención y su terapia con antimastíticos a base de cefapirinas. Mastitis bovina su reconocimiento clínico. México D. F. 1-13.
- Rinaldi M, Li RW, Capuco AV. 2010. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 138:267-279.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Biol Mamm Gland*. 480:247-258.
- 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.
- Rivas AL, Tadevosyan R, Quimby FW, Lein DH. 2002. Blood and milk cellular immune responses of mastitic non-periparturient cows inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can J Vet Res*. 66:125-131.
- Roberson J. 1999. The Epidemiology of *Staphylococcus aureus* on Dairy Farms, in National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. 38.
- Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Besser TE. 1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol*. 30:3217-3219.
- Rossitto PV, Ruiz L, Kikuchi Y, Glenn K, Ruiz K, Watts JL, Cullor JS. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococcus* isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J Dairy Sci*. 85:132-138.
- Roussel P, Cunha P, Porcherie A, Petzl W, Gilbert FB, Riollet C, Zerbe H, Rainard P and Germon P. 2015. Investigating the contribution of IL-17A and IL-17F to the host response during *Escherichia coli* mastitis. *Vet Res*. 46:56.

- Sampimon OC, Barkema HW, Berends IM, Sol J, Lam TJ. 2009. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet Microbiol.*134:37-44.
- Sánchez-Capelo A.2005. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:15-34.
- Saran A, Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Ed. Inter-Médica SAICI. 1: 9-14, 49-62, 99-108, 125-132.
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S. 2006. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 6:1087-1095.
- Sawa MB and Wojciech N. 2012. Dry period length and performance of cows in the subsequent production cycle. *Archiv Tierzucht* 2:140-147.
- Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 144:270-289.
- Schukken Y, Chuff M, Moroni P. 2012. “The “other” gramnegative bacteria in mastitis,” *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice*, vol. 28:239–256.
- Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas DS. 1992. The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med.* 176:1091-1098.
- Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas DS. 1992. The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med.* 176:1091-1098.
- Shafer-Weaver KA, Corl CM, Sordillo LM. 1999. Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. *J Dairy Sci.* 82:1696-1706.
- Shafer-Weaver, KA, Sordillo LM. 1996. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 79:1347-1352.

- Shafer-Weaver KA, Sordillo LM. 1997. Bovine CD8C suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet Immunol Immunopathol.* 56:53-64.
- Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. 1971. *Bovine Mastitis.* Lea & Febiger, Philadelphia, EE.UU. 360.
- Schmierer B, Hill CS. 2007. TGF- β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 8:970-982.
- Schwarz D, Diesterbeck US, König S, Brügemann K, Schlez K, Zschöck M, Wolter W, Czerny CP. 2011a. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *J Dairy Sci.* 94:5033-5044.
- Schwarz D, Diesterbeck US, König S, Brügemann K, Schlez K, Zschöck M, Wolter W, Czerny CP. 2011b. Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *J Dairy Res.* 78:448-55.
- Schwarz D, Rivas AL, König S, Diesterbeck US, Schlez K, Zschöck M, Wolter W, Czerny CP. 2013. CD2/CD21 index. A new marker to evaluate udder health in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:5106-5119.
- Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA. 1999a. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 4:153-164.
- Schorr K, Li M, Bar-Peled U, Lewis A, Heredia A, Lewis B, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Jäger R, Weiher H, Furth PA. 1999b. Gain of Bcl-2 is more potent than bax loss in regulating mammary epithelial cell survival *in vivo*. *Cancer Res.* 59:2541-2545.
- Silberstein GB, Flanders KC, Roberts AB, Daniel CW. 1992. Regulation of mammary morphogenesis: Evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor- β 1. *Dev Biol.* 152:354-362.

- Shoshani E, Leitner GB, Hanochi A, Saran Y, Shpigel N, Berman A. 2000. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. J Dairy Res. 67:155-169.
- Skyberg JA, Thornburg T, Rollins M, Huarte E, Jutila MA, Pascual DW. 2011. Murine and bovine $\gamma\delta$ T cells enhance innate immunity against *Brucella abortus* infections. PLoS One. 6:21978.
- Sladek Z, Rysanek D. 2000. Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary gland during induced influx. Vet Res. 31:553-563.
- Sladek Z, Rysanek D. 2006. The role of CD14 during resolution of experimentally induced *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 29:243-262.
- Sladek Z, Rysanek D, Faldyna M. 2005. Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland neutrophils *in vitro*. Vet Med Czech. 50:11-23.
- Slama P, Sladek Z, Rysanek D, Langrova T. 2009. Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland lymphocytes. Res Vet Sci 87 233-238.
- Smith KL, Hogan JS. 1993. Environmental mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 9:489-498.
- Smith KL, Hogan JS. 1997. Risk factors for environmental streptococcal intramammary infections. Proc. Symp. Ontario Veterinary College, Canada. 2:42-50.
- Smith KL, Oliver SP. 1981. Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland. Adv Exp Med Biol. 137:535-554.
- Smith KL, Todhunter DA. 1982. The physiology of mammary gland during the dry period and the relationship to infection. Proc. 21st Ann. Mtg. of Nat. Mastitis Council, Washington p 87-93.
- Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J Dairy Sci. 68:1531-1553.
- Smolenski GA, Wieliczko RJ, Pryor SM, Broadhurst MK, Wheeler TT, Haigh BJ. 2011. The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis. Vet Immunol Immunopathol. 143:125-30.

- Smulski S, Kaczmarowski ME, Lassa H. 2011. Occurrence, forms and etiologic agents of mastitis in Poland depending on size of farm. *Medycyna Weterynaryjna*. 67:190-193.
- Sohn EJ, Paape MJ, Peters RR, Fetterer RH, Talbot NC, Bannerman DD. 2004. The production and characterization of anti-bovine CD14 monoclonal antibodies. *Vet Res*. 35:597-608.
- Song PI, Park YM, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparidze N. 2002. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol*. 119:424-432.
- Solomon KA, Pesti N, Wu G, Newton RC. 1999. Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits TNF and TNFRII secretion. *J Immunol*. 63:4105-4108.
- Soltys J, Quinn MT. 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect Immun*. 67:6293-6302.
- Song E, Chen J, Antus B, Wang M, Xie Y, Yao H, Exton MS. 2000. Interleukin-2 enhances susceptibility of colon cancer cells to FasR mediated apoptosis by up-regulating Fas receptor level and down-regulating FAP-1 expression. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 13:113-122.
- Sordillo LM. 1996. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J Dairy Sci*. 79:1347-1352.
- Sordillo LM. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Prod Sci*. 98:89-99.
- Sordillo LM, Babiuk LA. 1991. 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 LM, Moss SF. 2002. *Helicobacter pylori* and apoptosis. *Methods Enzymol*. 358:319-34.
- Sordillo LM, Nickerson S. 1988. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am J Vet Res*. 49:1112-1119.

- Sordillo, LM, Nickerson SC, Akers RM, Oliver SP. 1987. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int J Biochem.* 19:1165-1172.
- Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Symposium: bovine immunology. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci.* 80:1851-1865.
- Sordillo LM, Streicher KL. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7:135-146.
- Sorensen JT, Enevoldsen C. 1991. Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 74:1277-1283.
- Sorensen MT, Norgaard JV, Theil PK, Vestergaard M, Sejrsen K, 2006. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. *J Dairy Sci.* 89:4632-4639.
- Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, and Tellam R. 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine.* 31:72-86.
- Strzępa A, Szczepanik M. 2011. IL-17-expressing cells as a potential therapeutic target for treatment of immunological disorders. *Pharmacol Rep.* 63:30-44.
- Supré K, Haesebrouck F, Zadoks RN, Vaneechoutte M, Piepers S, De Vliegher S. 2011. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *J Dairy Sci.* 94:2329-2340.
- Swain DK, Kushwah MS, Kaur M, Patbandha TK, Mohanty AK, Dang AK. 2014. Formation of NET, phagocytic activity, surface architecture, apoptosis and expression of toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) in neutrophils of mastitic cows. *Vet Res Commun.* 38:209-219.
- Szweda P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. 2012. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Pol J Microbiol.* 61:65-69.
- Taponen S, Jantunen A, Pyörälä E, Pyörälä S. 2003. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Vet Scand.* 44:53-62.

- Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 17:1-14.
- Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T y Akira S. 2000. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol.*12:113-117.
- Tao W, Mallard B. 2007. Differentially expressed genes associated with *Staphylococcus aureus* mastitis of Canadian Holstein cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 120:201-211.
- Tatarczuch L, Philip C, Lee CS. 1997. Involution of the sheep mammary gland. *J Anat.* 190:405-416.
- Tatarczuch L, Philip C, and Lee CS. 2000. Leucocyte phenotypes in involuting and fully involuted mammary glandular tissues and secretions of sheep. *J Anat.* 196:313-326.
- Tatarczuch L, Bischof RJ, Philip CJ, Lee CS. 2002. Phagocytic capacity of leucocytes in sheep mammary secretions following weaning. *J Anat.* 201:351-361.
- Taylor BC, Dellinger JD, Cullor JS, Scott JL. 1994. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8C. *Cell Immunol.* 156:245-253.
- Taylor BC, Keefe RG, Dellinger JD, Nakamura Y, Cullor JS, Stott JL. 1997. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunol.* 182:68-76.
- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 89:2542-2551.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science.* 281:1312-1316.
- Timón Morcuende R, Roger Márquez N, Jiménez Galán L. 2007. Importancia del período seco en el control de mamitis. *Frisona española.*158:98-100.
- Tizard IR. 2000. *Veterinary Immunology: an introduction.* Ed. B. Saunders Company; Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos, p. 375-377.

- Todar K. 2011. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Dep. de Bacteriología. Univ. de Wisconsin, Madison, Wisconsin.1-6.Disponible en:
<http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>
- Tollersrud T, Kenny K, Reitz A, Lee J. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolated of *Staphylococcus aureus* and others *Staphylococcus* *pp.* from Europe and the United States. J Clin Microbiol. 38:2998-3003.
- Tracey KJ. 1994. Tumor necrosis factor-alpha. En: The cytokine handbook, Ed. 2ª, San Diego C.A., Academic Press. 289-300.
- Trinidad P, Nickerson SC, Adkinson RW. 1990. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. J Dairy Sci. 73:639-447.
- Tumini M, Andreotti C, Baravalle C, Calvinho LF, Dallard BE. 2009. Identificación y cuantificación de linfocitos en glándula mamaria de vacas tratadas con un modificador de la respuesta biológica durante la involución. II Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Rosario, Santa Fe.
- Van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev. 15:294-309.
- Van Cruchten S, Van den Broeck W, Duchateau L, Simoens P. 2003. Apoptosis in the canine endometrium during the estrous cycle. Theriogenology. 60:1595-1608.
- Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vlieghe S. 2014. Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. J Dairy Sci. 97:5275-5293.
- Vissio C, Agüero DA, Raspanti CG, Odierno LM, Larriestra AJ. 2015. Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. Arch Med Vet. 47:7-14

- Vivier E, Malissen B. 2005. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol.* 6:17-21.
- Waarnker R, Isaacson P. Immunohistochemical Analysis of Lymphoid tissue. En *Neoplastic hematopathology*. Knowles D. Lippincott W.W. Philadelphia, 2001, Cap 4:227-253.
- Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut, S. 2000. IFN- β -1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN- β -1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol.* 165:548-557.
- Wang Y, Zarlenga DS, Paape MJ, Dahl GE. 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.
- Watanabe I, Ichiki M, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. 2007. TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages: A novel bacterial strategy against host innate immunity. *J Immunol.* 178:4917-4925.
- Wattiaux M. 2001. Mastitis: The disease and its transmission. *Dairy essentials: nutrition and feeding, reproduction and genetic selection, lactation and milking, raising dairy heifers*. Babcock Institute for International Dairy Research and Development. Univ. de Wisconsin-Madison. 23:89-92.
- Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Pepler M, Weiss AA. 1999. Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* 67:4264-4267.
- Welleberg G, Van Der Poel W, Van Oirschot J. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet Microbiol.* 236:1:2-21.
- Wellnitz O, Berger U, Schaeren W, Bruckmaier R. 2012. Mastitis severity induced by two *Streptococcus uberis* strains is reflected by the mammary immune response in vitro. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 154:317-323.

- Wellnitz O, Bruckmaier RM, 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J.* 192:148–152.
- Wellnitz O, Kerr DE. 2004. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 101:191–202.
- Werling D, Kaiser P. 2006. Innate immunity and vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 112:1.
- Wesson CA, Deringer J, Liou LE, Bayles KW, Bohach GA, Trumble WR. 2000. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infec Immun.* 68:2998–3001.
- Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O'Farrelly C. 2011. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunopathol.* 140:181-189.
- Woods A, Ellis, CR. 1994. *Laboratory Histopathology. A Complete Reference.* Longman Group Limited. London. 4.1-1 - 4.6-6.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevich RJ y Mathison JC. 1990. CD14 a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 249:1431-1433.
- Yamanaka H, Hisaeda K, Hagiwara K, Kirisawa R. Iwai, H. 2000. ELISA for bovine interleukin-1 receptor antagonist and its application to mastitic sera and whey. *J Vet Med Sci.* 62:661-664.
- Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schubert HJ, Seyfert HM. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF- α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol.* 45:1385-1397.
- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem.* 282:9358-9363.
- Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. 1997. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*. *Nature* 385:637-640.

- Yin, X.M. 2000. Signal transduction mediated by Bid, a prodeath Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res.* 10:161-167.
- Zadoks RN. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine. 239:2-3.
- Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Gröhn YT, Schukken YH. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci.* 84:590-599.
- Zadoks RN, Seyfert HM. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 144:270-289.
- Zarzynska J, Gajkowska B, Wojewodzka U, Dymnicki E, Motyl T. 2007. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland is accompanied by up-regulation of TGF- β 1 and suppression of somatotropic pathway. *Polish J Vet Sci.* 10:1-9.
- Zarzynska J, Motyl T. 2008. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. *Journal of physiology and pharmacology.* 59:275-288.
- Zecconi A, Binda E, Borromeo V, Piccinini R. 2005. Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates or somatic cell counts. *J Dairy Res.* 72:203-208.
- Zecconi A, Calvinho LF, Fox KL. 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *IDF Bulletin.* 408:1-36.
- Zetterlund A, Larsson PH, M€uller-Suur C, Palmberg L and Larsson K. 1998. Budesonide but not terbutaline decreases phagocytosis in alveolar macrophages. *Respir Med.* 92:162-166.
- Zhang H, Heim J and Meyhack B. 1998. Redistribution of bax from cytosol to membranes is induced by apoptotic stimuli and is an early step in the apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 251:454-459.
- Zhang H, Issekutz AC. 2002. Down-regulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor. *Am J Pathol.* 160:2219-2230.

- Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci.* 86:57-65.
- Zhu J, Yamane H, Paul WE. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 28:445-489.

Publicaciones

PUBLICACIONES ORIGINADAS DE LA TESIS

2014 - Andreotti, C.S.; Pereyra, E.A.; Baravalle, C.; Renna, M.S.; Ortega, H.H.; Calvinho, L.F.; Dallard, B.E. (2014) *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infection modifies the protein expression of transforming growth factor beta (TGF- β) subfamily components during active involution. *Research in Veterinary Science*. 96:5-14.

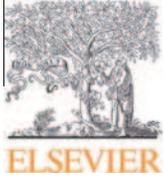
PUBLICACIONES EN COLABORACIÓN

2015 - Pereyra EAL, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti C, Russi R, Calvinho LF, Diez C, Dallard BE. 2015. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*. 183 (2016) 69-77.

2015 - Baravalle C, Silvestrini P, Cadoche MC, Beccaria C, Andreotti CS, Renna MS, Pereyra EAL, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE. Intramammary infusion of *Panax ginseng* extract in bovine mammary gland at cessation of milking induces changes in the expression of toll-like receptors, MyD88 and NF-kB during early involution. *Research in Veterinary Science*. 100:52-60.

MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN PARA SU PUBLICACIÓN:

Andreotti, C.S.; Pereyra, E.A.; Baravalle, C.; Renna, M.S.; Ortega, H.H.; Calvinho, L.F.; Dallard, B.E. 2015. *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infection modifies proliferation-apoptosis balance during active involution (manuscrito en edición).



Staphylococcus aureus chronic intramammary infection modifies protein expression of transforming growth factor beta (TGF- β) subfamily components during active involution



Carolina S. Andreotti^{a,b}, Elizabet A.L. Pereyra^{a,b}, Celina Baravalle^{a,b}, María S. Renna^{a,b}, Hugo H. Ortega^{a,b}, Luis F. Calvino^{c,d}, Bibiana E. Dallard^{a,b,*}

^aLaboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina

^bInstituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

^cEstación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), C.C. 22 (2300) Rafaela, Santa Fe, Argentina

^dFacultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2013

Accepted 1 November 2013

Keywords:

Transforming growth factor beta

Staphylococcus aureus

Mastitis

Involution

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine whether *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infection (IMI) influences protein expression of TGF- β subfamily components and collagen I and to examine the histomorphometric changes that occur in mammary stroma and parenchyma during active mammary gland involution. Twenty-one Holstein non-pregnant cows in late lactation either uninfected or with chronic natural *S. aureus* IMI were included in this study. Cows were slaughtered at 7, 14 and 21 d after cessation of milking and samples for immunohistochemical and morphometric analysis were taken. Protein expression of TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 was significantly higher in chronically infected quarters than in uninfected controls at the three involution stages studied. Immunostaining of TGF- β 1 and TGF- β 3 and collagen I was significantly higher in *S. aureus*-infected quarters than in uninfected controls at every involution time evaluated. The percentages of tissue area composed of parenchyma and intralobular stroma were significantly higher in *S. aureus*-infected than in uninfected quarters. Chronic *S. aureus* mastitis modifies protein expression of the three TGF- β isoforms and type 1 and 3 receptors, which was associated with changes directed to limit the scope of inflammation and injury to the host.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The nonlactating interval in dairy cows, commonly referred to as the “dry period”, is an important determinant of milk production in the subsequent lactation (Remond et al., 1997; Capuco and Akers, 1999). During the dry period the mammary gland of dairy cows undergoes extensive remodeling both at early involution and mammogenesis phases (Capuco and Akers, 1999). Significant renewal and replacement of senescent epithelial cells, as well as changes in intralobular stromal composition, take place particularly during mammogenesis (Capuco et al., 1997; Sorensen et al., 2006; Annen et al., 2007; De Vries et al., 2010). The early dry period is a critical stage, since changes that lead to increased concentration of protective factors, compared with lactating mammary glands, occur gradually over several days (Oliver and Sordillo, 1989). Increased susceptibility to intramammary infections (IMI)

during early involution has been related to changes during the involution process that may facilitate bacterial penetration of the streak canal, interfere with natural defense mechanisms, and enhance bacterial growth (Oliver and Sordillo, 1989). In addition, some IMI present at drying off can persist through the dry period despite the use of antibiotic therapy, leading to increased milk loss in the subsequent lactation (Eberhart, 1986).

Staphylococcus aureus is an opportunistic, contagious pathogen and the most common cause of mastitis in dairy cattle (Zecconi et al., 2006). Although infection can result in obvious clinical mastitis, *S. aureus* often evades the immune response resulting in a subclinical chronic infection that can persist for the life of the animal (Zecconi et al., 2006). The chronic nature of *S. aureus* mastitis in dairy cows and the ability of the bacterium to withstand inflammatory responses have been associated with a decreased immune response (Nagahata et al., 2011; Schukken et al., 2011; Wellnitz and Bruckmaier, 2012). Bannerman et al. (2004) suggested that the limited early cytokine response to *S. aureus* in experimentally induced mastitis may contribute to the organism ability to establish chronic IMI. However, few studies have evaluated innate immune responses in cows with naturally occurring chronic

* Corresponding author at: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Rvdo. Padre Kreder 2805, (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina. Tel.: +54 3496 420639; fax: +54 3496 426304.

E-mail address: bdallard@fcv.unl.edu.ar (B.E. Dallard).

S. aureus mastitis during lactation (Riollet et al., 2001; Nagahata et al., 2011) and natural involution (Dallard et al., 2009). Recently, studies of serum proteomics in cows with clinical and subclinical mastitis were carried out to determine differential inflammatory proteins expression that can contribute to a better understanding of the pathophysiology of mastitis (Turk et al., 2012).

Transforming growth factor- β (TGF- β) are the founding members of a large superfamily consisting of over 40 ligands, including activins, inhibins, nodals, bone morphogenetic proteins (BMPs), and growth and differentiation factors (Kingsley, 1994). There is evidence of expression of several of these superfamily members in various stages of mammary gland development (Phippard et al., 1996; Jeruss et al., 2003; Manickam et al., 2008); however, the TGF- β are the only members that have been studied extensively in the involution process (Plath et al., 1997; Plaut et al., 2003; Zarzynska et al., 2007; Flanders and Wakefield, 2009; De Vries et al., 2010, 2011).

Mammals express three highly homologous isoforms of TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3) which share 70% sequence identity in the biologically active C-terminal region, all bind to the same receptor complex and activate the same downstream signaling pathways. Most cell types express one or more of the three isoforms of TGF- β ; being TGF- β 1 the most abundant and intensively studied isoform. Effects of TGF- β are mediated by binding to specific cell surface receptors (type 1, 2, or 3 receptors) present on most cell types. The type 1 and 2 receptors are directly involved in signal transduction, whereas the type 3 receptor is thought to enhance binding of TGF- β to one of the other receptor subtypes (Flanders and Wakefield, 2009).

Transforming growth factor- β is a pleiotropic cytokine that regulates cell growth and differentiation, as well as inflammatory responses (Letterio and Roberts, 1998; Bonewald, 1999). In the mammary gland, TGF- β regulates ductal growth and alveolar development via its inhibitory effect on epithelial cell growth and its stimulatory effect on fibroblasts and other stromal cells (Daniel et al., 2001). In addition to its role in mammary gland development, TGF- β has been shown to suppress immune and inflammatory responses, although some pro-inflammatory properties have been ascribed to this cytokine (Letterio and Roberts, 1998; Ashcroft, 1999; Flanders and Wakefield, 2009). Whether TGF- β functions as an activator or suppressor of inflammation depends on the location and activation state of the cells that TGF- β stimulates, as well as the environmental milieu of other cytokines/immunoregulatory factors present. Several studies have depicted the expression of the classic pro-inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-8, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) during *S. aureus* mastitis (Riollet et al., 2001; Bannerman et al., 2004; Bannerman, 2009; Dallard et al., 2009; Schukken et al., 2011); however, little is known about changes in the expression of other cytokines, including TGF- β subfamily components, during IMI by this microorganism.

The objectives of this study were to determine whether *S. aureus* chronic IMI influences the protein expression of TGF- β subfamily components during active involution and to examine the histomorphometric changes that occur in mammary stroma and parenchyma and collagen I protein expression in chronic *S. aureus* infection.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twenty-one Holstein non-pregnant cows in late lactation (weeks 31–36) from the Rafaela Experiment Station of INTA herd were included in the study. Cows were from parity 3 to 5, milked

twice daily and produced an average of 12 kg milk/d before interruption of lactation. Cows with similar lactation number were included in each group. All procedures used in this study were approved by the Ethics and Security Committee of the Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral and consistent with the Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching, Federation of Animal Sciences Societies (FASS, 1999).

2.2. Experimental design

The infection status of mammary quarters was determined within 6 months before initiation of the experiment and confirmed 20 d and 3 d before cessation of milking. Infections were naturally acquired either in the previous dry period or during the first 2 months of the lactation preceding initiation of the study. Cows with *S. aureus* mastitis were selected based on results of monthly somatic cell counts (SCC > 250 \times 10³ cells/ml) and subsequent testing by bacteriological analysis of quarter milk. A quarter was considered to be infected if *S. aureus* was isolated from two consecutive samples. Infected quarters were randomly selected from cows showing at least two quarters infected with *S. aureus*. Only animals with subclinical IMI at the time of milking interruption were included. Uninfected quarters were selected from cows free of infection at the time of sampling with negative results of bacteriological analysis of quarters and SCC less than 250 \times 10³ cells/ml.

Cows were slaughtered at 7, 14 and 21 d after cessation of milking at a local abattoir and samples for histological analysis were taken. The experimental unit of study was the mammary quarter. Uninfected ($n = 8$) and *S. aureus* infected ($n = 8$) mammary quarters were included in each group (7, 14 and 21 d). Mammary secretion samples were aseptically collected for bacteriological analysis using standard procedures (Oliver et al., 2004) 3 d before cessation of milking, immediately before the last milking and every 48 h after cessation of milking. Before sampling, the first 3–4 streams of milk were discarded, and teat ends were disinfected with cotton swabs soaked in 70% alcohol. Two to 3 ml of quarter milk were aseptically collected into a 10 ml sterile plastic tube for bacteriological analysis. According to the eligibility criterion used, from 24 cows initially available, 21 were finally included in the study (12 cows with at least two quarters infected with *S. aureus* and 9 uninfected cows).

2.3. Bacteriological examination

Mammary secretion samples (10 μ l) were streaked onto blood agar plates supplemented with 5% bovine blood and incubated for 48 h aerobically at 37 °C. Plates were examined for bacterial growth at 24 h and 48 h. *S. aureus* was identified based on the hemolytic pattern on blood agar, catalase and coagulase tests and differentiated from other coagulase-positive *Staphylococci*, by acetoin production and selective growth on P agar with 7 μ g/ml acriflavine (Roberson et al., 1992; Oliver et al., 2004). Other mastitis pathogens were identified based on standard methodology (Oliver et al., 2004). The presence of one colony of *S. aureus* on blood agar was considered as a positive identification; therefore, detection limit was 100 CFU/ml.

2.4. Tissue sample preparation

Immediately after cows were slaughtered, three tissue samples were taken from randomly selected mammary quarters from three regions: upper limit of the gland cistern, approximately midway between the upper limit of the gland cistern and the dorsal boundary of the mammary gland at a depth of 4 cm (lobulo-alveolar zone), following previous descriptions (Rinaldi et al., 2010; Dallard

et al., 2010). Tissue samples of approximately 1 cm³ were fixed in 4% neutral buffered formalin, for 8 h at 4 °C and then washed in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4; 0.01 M). For light microscopy, fixed tissues were dehydrated and embedded in paraffin wax. Sections (5 µm) were mounted on slides previously treated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma–Aldrich, St. Louis MO, USA) and assigned for staining with haematoxylin and eosin (HE) for mammary gland structures preliminary observation or for use in immunohistochemistry (IHC) procedures. Additional sections of mammary tissues were transferred into a freezing vial, weighed and placed in liquid nitrogen for western blot assays.

2.5. Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, the streptavidin–biotin immunoperoxidase method was performed as described by Dallard et al. (2013). Briefly, sections were dewaxed, hydrated and subjected to microwave pretreatment in citrate buffer (pH 6.0) for antigen retrieval. Endogenous peroxidase activity was blocked with 1% H₂O₂ in methanol and non-specific binding was blocked with 10% normal goat serum (Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, MO). Tissue sections were incubated with the primary antibodies (Table 1) for 18 h at 4 °C. Slides were washed with PBS and incubated at room temperature for 30 min with a biotin-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Table 1) as a secondary reagent. Detection was by a streptavidin-peroxidase solution (BioGenex, San Ramon, CA), with 3,3-diaminobenzidine (DAB; Dako, Carpinteria, CA) as chromogen. The sections were then counterstained with Mayer hematoxylin, dehydrated, and mounted. Negative control sections were included in which the primary antibody was replaced by non-immune rabbit serum (Dallard et al., 2009). To exclude the possibility that endogenous peroxidase activity was unsuccessfully blocked, some sections were incubated with DAB reagent alone. Serial sections of bovine mammary tissue similarly processed and with known reactivity for the antigen were used as positive controls in each assay to normalize the image analysis.

2.6. Antigen/antibody specificity

The homology between the target peptide of each antibody and the correspondent bovine protein was tested using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST software; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to determine the peptide locations and to confirm antigen specificity. To test specificity of the primary antibodies used in this study (Table 1), bovine mammary tissue extracts were separated in SDS–polyacrylamide gels (15% resolving gel for TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 and TGF-βR1, and 8% resolving gel for TGF-βR3 and collagen I), as previously described (Baravalle et al., 2011). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes

(Amersham, Buckinghamshire, UK), blocked for 1 h 30 min in 5% nonfat milk in TBS containing 0.05% Tween-20 (Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, MO) and then incubated overnight at 4 °C with specific primary antibodies (Table 1). Following washing, membranes were treated for 1 h 30 min with secondary peroxidase-conjugated antibody (Table 1). Immunopositive bands were visualized with a chemiluminescent detection kit (ECL-Plus; GE-Amersham, Buckinghamshire, UK).

2.7. Image analysis

Image analysis was performed using the Image Pro-Plus 3.0.1 system (Media Cybernetics, Silver Spring, MA). Images were digitized with an Olympus C5060 digital camera mounted on a conventional light microscope (Olympus BH-2; Olympus Co., Tokyo, Japan) using objective magnification of 40×. Image resolution was set to 1200 × 1600 pixels. Each pixel of the image corresponded to 0.13 µm² at the respective magnification and each field represented a tissue area of 0.031 mm². The system captured each image and automatically corrected for background. This prevented differential readings due to different lighting conditions. No further image processing was done. Details of image analysis as a valid method for quantifying expression levels and the methodological details were previously described (Dallard et al., 2008; Baravalle et al., 2011; Dallard et al., 2013). Briefly, the immunohistochemical stained area (IHCSA) for each antibody reaction was calculated as a percentage of total area evaluated through the color segmentation analysis that extracts objects by locating all objects of the specific color (brown stain). The brown stain was selected with a sensitivity of 4 (maximum 5) and a mask was next applied to make separation of colours permanent. The IHCSA (% of black area) was calculated from at least 50 images in each one of the following structures: alveoli, ducts and interstitial tissue. Expression of TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-βR1, TGF-βR3 and collagen I was evaluated by positive IHCSA.

2.8. Morphometric studies

Quantitative analysis was used to determine percentage of mammary tissue area composed of intralobular and interlobular stroma and parenchyma. Twenty images were taken per slide at 20× magnification, avoiding areas close to tissue section edges. At the used magnification, each field in the monitor represented a tissue area of 0.28 mm². The percentages of intra and interlobular stroma and parenchyma were obtained using the manual measurement tool in Image Pro-Plus 3.0.1 system. First, the area composed by parenchyma was calculated and then the area composed by intralobular stroma. The interlobular stromal area was calculated

Table 1

Antibodies including clone, source and dilution used for immunohistochemistry (IHC) and western blot (WB) analysis of transforming growth factor-β family proteins and collagen I.

Antigen	Clone and source	Dilution IHC	Dilution WB
<i>Primary antibodies</i>			
TGF-β1	Polyclonal (sc-146, Santa Cruz Biotechnology)	1:25	1:15
TGF-β2	Polyclonal (sc-90, Santa Cruz Biotechnology)	1:200	1:75
TGF-β3	Polyclonal (sc-83, Santa Cruz Biotechnology)	1:200	1:100
TGF-βR1	Polyclonal (ab31013, Abcam)	1:25	1:15
TGF-βR3	Polyclonal (ab28366, Abcam)	1:50	1:25
Collagen I	Polyclonal (2150-0510, AbD Serotec)	1:350	1:200
<i>Secondary antibodies</i>			
Biotinylated anti-rabbit IgG	Polyclonal (Zymed)	1:100	–
Anti-rabbit IgG peroxidase	Polyclonal (Amersham)	–	1:2000

as the difference between the total tissue area and the sum of the area composed by intralobular stroma and parenchyma.

2.9. Statistical analysis

A statistical software package (SPSS 11.0 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, IL) was used to perform statistical analysis. Data were analyzed using the general linear model (GLM) procedure. The

model tested for main effects of infection status (chronic *S. aureus* mastitis or uninfected control), time (7, 14 and 21 d of involution) and the infection status \times time interaction. When the infection status \times time interaction was significant, *t*-tests were used to make comparisons between individual means. Differences of $P < 0.01$ were considered significant. Data are presented as means of three tissue samples obtained from the same mammary quarter \pm SEM (standard error of the mean).

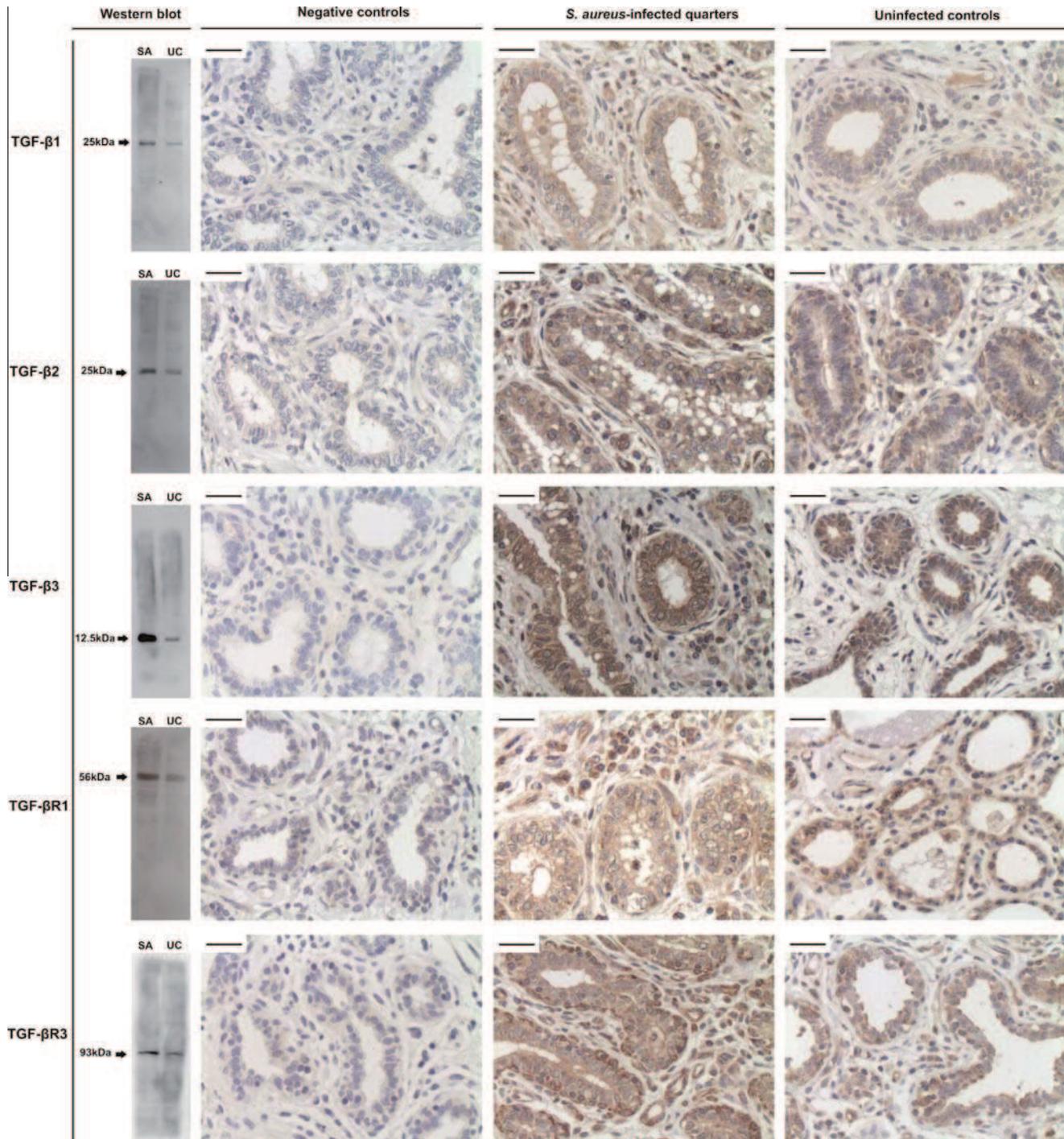


Fig. 1. Representative images of TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β R1 and TGF- β R3 immunostaining in *S. aureus*-infected quarters (SA) and uninfected controls (UC) at 14 d of involution are shown in the right panels. Verification of antibody specificity by western blot analysis of mammary tissue homogenates and negative controls for immunostaining are shown in the left two panels, respectively. Magnification is the same for all panels (400 \times) and is indicated by 25 μ m bars.

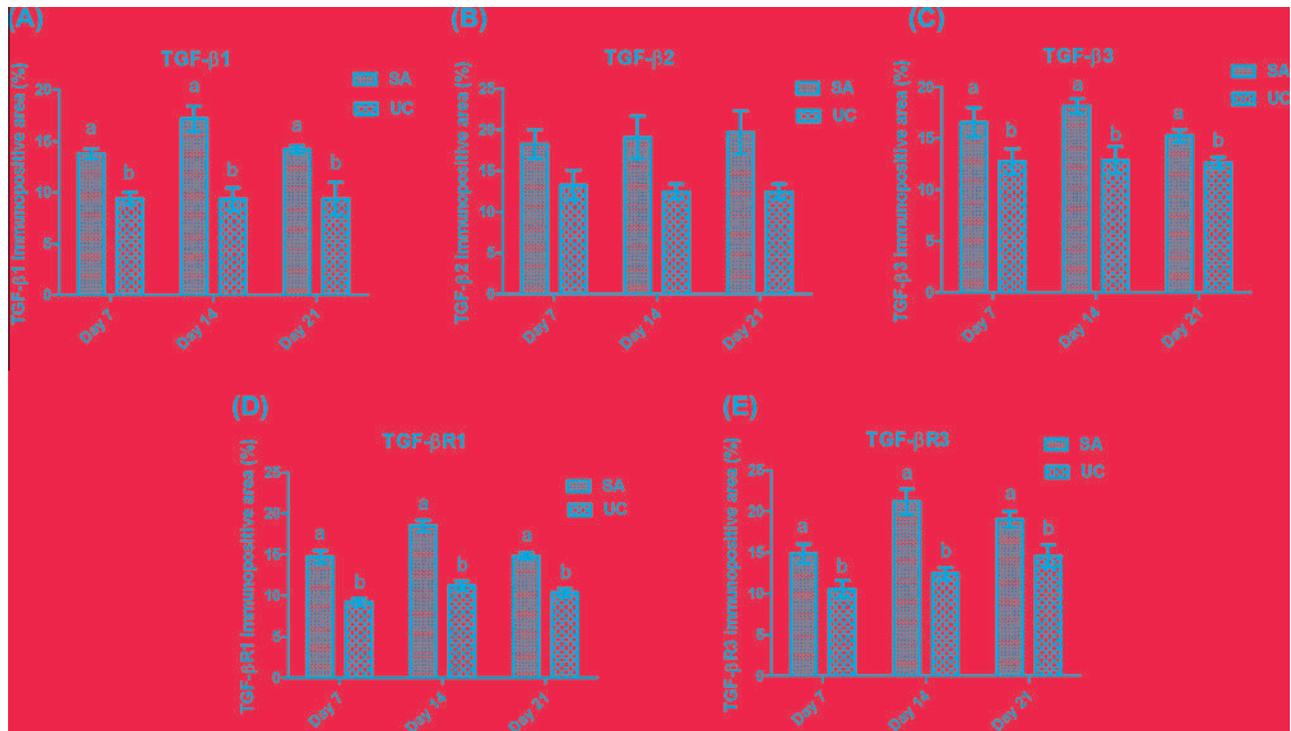


Fig. 2. Relative expression (measured as % of immunopositive area) of (A) TGF-β1, (B) TGF-β2, (C) TGF-β3, (D) TGF-βR1 and (E) TGF-βR3 in *S. aureus*-infected quarters (SA) and uninfected controls (UC) at 7, 14 and 21 d of involution. Values represent the mean \pm standard error of the mean (SEM). Means (a–b) for each time period without a common letter differ ($P < 0.01$).

3. Results

3.1. Antibody specificity

Western blot recognition of proteins of the TGF-β subfamily members and collagen I in mammary homogenates from quarters infected with *S. aureus* and uninfected quarters are summarized in Figs. 1 and 3. Western blot analysis revealed positive bands of appropriate sizes for each of the proteins studied. The TGF-β1 and TGF-β2 antibodies detected a single band at 25 kDa corresponding to the active homodimer (Fig. 1). The TGF-β3 antibody detected a single band at 12.5 kDa corresponding to the mature form (Fig. 1); TGF-βR1 a single band at 56 kDa (Fig. 1); TGF-βR3 a single band at 93 kDa (Fig. 1) and collagen I antibody detected a single band at 95 kDa (Fig. 3).

3.2. Immunohistochemistry of TGF-β subfamily members

Representative patterns of immunostaining of TGF-β subfamily members in *S. aureus*-infected and uninfected quarters are shown in Fig. 1, and a quantitative analysis of the expression of these proteins from immunohistochemical analysis is shown in Fig. 2.

Transforming growth factor-β subfamily proteins were expressed in stromal and epithelial cells in tissue sections from all analyzed groups (Fig. 1). The patterns of localization for TGF-β1, TGF-β2 and TGF-β3 in mammary tissue were similar in both *S. aureus*-infected than uninfected quarters. Positive reaction was observed in the cytoplasm of epithelial cells in alveoli and ducts. Cytoplasm of myoepithelial cells lining the ducts and alveoli showed moderate staining for all three isoforms. Stromal cells (fibroblast and endothelial cells), extracellular matrix components (collagen fibers) and immune cells (monocytes–macrophages, lymphocytes and plasma cells) showed intense staining.

Protein expression of TGF-β1 in mammary tissue was higher in *S. aureus*-infected than uninfected control quarters ($P < 0.001$) and was affected by time of sampling ($P < 0.001$). There was a significant interaction between infectious status and time of sampling ($P < 0.001$), being percentages of IHCSA for TGF-β1 higher in *S. aureus*-infected than in uninfected control quarters at 7, 14 and 21 d of involution ($P < 0.001$). The highest protein expression in infected quarters was observed at 14 d of involution.

Protein expression of TGF-β2 in mammary tissue was higher in *S. aureus*-infected than uninfected control quarters ($P < 0.001$) and was not affected by time of sampling ($P = 0.587$). There was no interaction between infectious status and time of sampling ($P = 0.128$).

Protein expression of TGF-β3 in mammary tissue was higher in *S. aureus*-infected than uninfected control quarters ($P < 0.001$) and was affected by time of sampling ($P = 0.004$). There was a significant interaction between infectious status and time of sampling ($P = 0.015$). Percentages of IHCSA for TGF-β3 were higher in *S. aureus*-infected than in uninfected control quarters at 7, 14 and 21 d of involution ($P < 0.001$). The highest protein expression in infected quarters was observed at 14 d of involution.

Transforming growth factor-β type 1 and 3 receptors were abundantly expressed and localized along the ductal and alveolar epithelium (Fig. 1). Light staining of TGF-βR1 and TGF-βR3 in the intralobular and interlobular stroma was observed. Stromal cells like fibroblasts showed moderate perinuclear cytoplasm staining. Immune cells (monocytes–macrophages, lymphocytes and plasma cells) showed intense staining. There was intense immunostaining for TGF-βR3 and weak staining for TGF-βR1 in the cytoplasm of myoepithelial cells.

Protein expression of TGF-βR1 and TGF-βR3 was affected by *S. aureus* infection ($P < 0.001$) and by time of sampling ($P < 0.001$). The interaction between infectious status and time of sampling for both receptors was significant ($P < 0.001$). At 7, 14 and 21 d of involution the percentages of IHCSA for TGF-βR1 and TGF-βR3 were

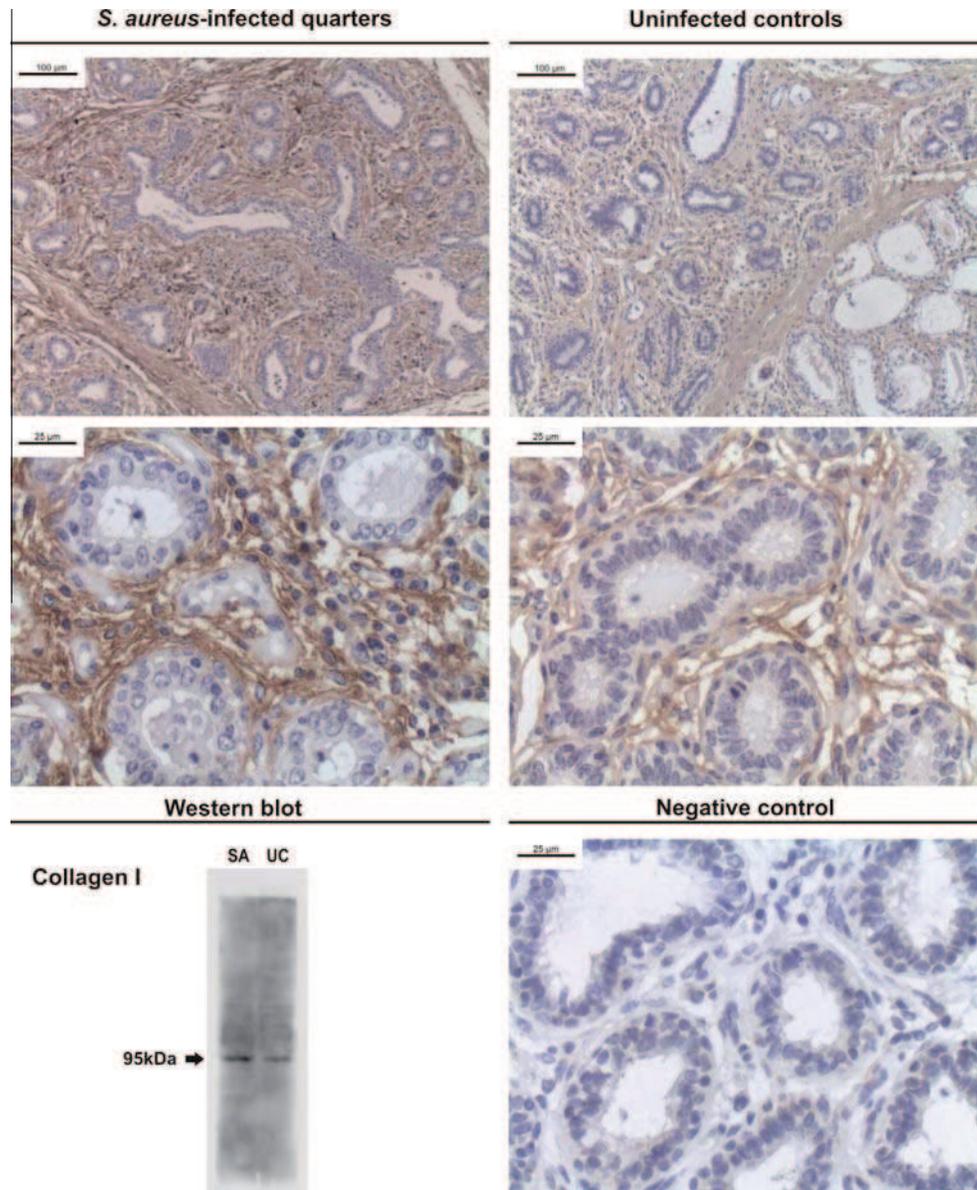


Fig. 3. Representative images of bovine collagen I immunostaining in *S. aureus*-infected quarters (SA) and uninfected controls (UC) at 14 d of involution are shown in the top panel. Verification of antibody specificity by western blot analysis of mammary tissue homogenates and negative control for immunostaining are shown in the inferior panel, respectively. The magnification used is indicated by scale bars.

higher in *S. aureus*-infected than in uninfected control quarters ($P < 0.001$). For both receptors the highest protein expression in infected quarters was observed at 14 d of involution (Fig. 2).

3.3. Immunohistochemistry of collagen I

Collagen I staining was present in all tissue sections at all involution stages evaluated and was associated with the intra and interlobular stroma components. Representative images of immunohistochemistry for collagen I are shown in Fig. 3 and a quantitative analysis of the expression of this protein from immunohistochemical analysis is shown in Fig. 4.

In infected quarters, alveoli and large ducts were surrounded by a continuous collagen structure in the zone adjacent to the epithelium, and intense collagen staining within intralobular stroma was observed. Moreover, the interlobular stroma exhibited intensely stained and tightly packed collagen fibers (Fig. 3). In uninfected quarters, the intralobular stroma collagen staining was diffuse

and less intense than in infected quarters. Alveoli and large conduits were surrounded by loosely arranged collagen fibers. As in infected quarters, the interlobular stroma exhibited intensely stained and tightly packed collagen fibers (Fig. 3).

Protein expression of collagen I in mammary tissue was higher in *S. aureus*-infected than in uninfected control quarters ($P < 0.001$) and was affected by time of sampling ($P < 0.001$). There was a significant interaction between infection status and time of sampling ($P = 0.001$). Percentages of IHCSA for collagen I were higher in *S. aureus*-infected than in uninfected control quarters at 7, 14 and 21 d of involution ($P < 0.001$). The highest protein expression in infected quarters was observed at 21 d of involution (Fig. 4).

3.4. Parenchymal and stromal area

3.4.1. Parenchyma

The parenchymal percentages in quarters from cows with *S. aureus* IMI were higher than for uninfected cows ($P < 0.001$)

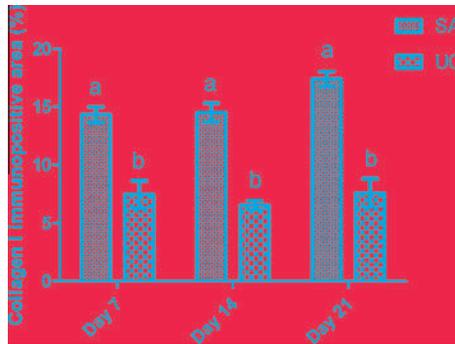


Fig. 4. Relative expression (measured as% of immunopositive area) of collagen I in *S. aureus*-infected quarters (SA) and uninfected controls (UC) at 7, 14 and 21 d of involution. Values represent the mean \pm standard error of the mean (SEM). Means (a–b) for each time period without a common letter differ ($P < 0.01$).

and were affected by time of sampling ($P < 0.001$; Fig. 5). The interaction between infectious status and time of sampling was significant ($P < 0.001$). At 7 d of involution, the percentages of tissue area composed of secretory epithelium were lower in infected quarters compared with uninfected quarters ($P = 0.018$). At 14 and 21 d of involution the percentages of parenchyma in quarters from cows with *S. aureus* IMI were higher than for uninfected cows ($P < 0.001$).

3.4.2. Intralobular stroma

There was a significant effect of *S. aureus* infection on the percentage of intralobular stroma ($P < 0.001$) with higher percentages in infected compared with uninfected quarters at every time of sampling (Fig. 5). The intralobular stromal area was affected by time of sampling ($P < 0.001$) and the interaction between infection status and time of sampling was significant ($P < 0.001$). At 7, 14 and 21 d of involution the percentages of intralobular stroma in quarters from the cows with *S. aureus* IMI were higher than for uninfected cows ($P < 0.001$).

3.4.3. Interlobular stroma

There was a significant effect of *S. aureus* infection on the percentage of interlobular stroma ($P < 0.001$), with lower percentages in infected compared with uninfected quarters at every time of sampling (Fig. 5). The interlobular stromal area was affected by time of sampling ($P < 0.001$) and the interaction between infection status and time of sampling was significant ($P < 0.001$). At 7, 14 and 21 d of involution the percentages of interlobular stroma in quarters from cows with *S. aureus* IMI were lower than for uninfected cows ($P < 0.001$). In infected quarters the mean of percentages of interlobular stromal area remained unchanged throughout the sampling period (Fig. 5).

4. Discussion

In the present study, the effect of chronic *S. aureus* IMI on protein expression of TGF- β subfamily components during mammary gland involution was assessed. In addition, we determined the influence of chronic infection on collagen I expression and the histomorphometric changes that occur in mammary stroma and parenchyma during active involution. All TGF- β subfamily components evaluated were expressed in mammary parenchyma and stroma structures in both infected and uninfected quarters during active involution. These findings are consistent with previous studies in cows where TGF- β components were detected in mammary parenchyma and stroma by immunohistochemistry (Plaut et al., 2003; De Vries et al., 2010).

The contribution of TGF- β to the pathophysiological processes that are operative in the gland during *S. aureus* IMI is ill-defined. In the present study, protein expression of three isoforms of TGF- β was significantly higher in chronically infected quarters than in uninfected controls. It has been shown that TGF- β suppresses inflammation by down-regulating the production of proinflammatory chemokines and cytokines (Fargeas et al., 1992; Flanders and Wakefield, 2009) and by enhancing macrophage clearance of bacterial debris, inflammatory cells, and injured parenchymal cells (Letterio and Roberts, 1998; Ashcroft, 1999; Flanders and Wakefield, 2009). In a previous study, we observed an increased number of monocytes-macrophages staining with CD14 antibody in mammary quarters chronically infected with *S. aureus* at 7, 14 and 21 d of involution, indicating the involvement of cells bearing this receptor in the local immune reaction of mammary gland against this organism (Dallard et al., 2009). The increased protein expression of TGF- β observed in the present study, in association with previous findings (Dallard et al., 2009), suggests that these cytokines can be involved in repair of injured mammary parenchymal cells in chronic *S. aureus* infection during mammary involution.

A recent *ex vivo* study on bovine mammary gland explants (Zarzynska et al., 2007) revealed that an increase in the extent of apoptosis measured by expression of CPP-32 and the 89 kDa fragment of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (a product of caspase-3 activity) during the dry period was accompanied by highly significant increases in TGF- β 1 and its receptor's (TGF- β 2) expression. These results may indicate a causal relationship between expression of this cytokine and induction of apoptosis *in vivo*, as it has been reported earlier using bovine MEC cultures exposed to exogenous TGF- β 1 (Kolek et al., 2003; Gajewska and Motyl, 2004; Gajewska et al., 2005; Zarzynska and Motyl, 2005). In a previous study, we observed an increase of epithelial and stromal cells apoptosis assessed using a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and active caspase-3 expression in chronically *S. aureus*-infected quarters compared with uninfected controls during the first 3 weeks of involution (Dallard et al., 2008). In the present study, percentages of IHCSA for TGF- β 1 were significantly higher in *S. aureus*-infected than in uninfected control quarters at the three involution stages studied, with the highest protein expression at 14 d of involution. Taken together, these results point out that this cytokine may be involved in the regulation of apoptosis in chronically *S. aureus*-infected quarters.

Musters et al. (2004) demonstrated that TGF- β 1 selectively acts on the stromal compartment of the bovine mammary gland by increasing cell proliferation and gene expression of the extracellular matrix protein fibronectin. In a previous study, we observed a significant increase in stromal cells proliferation in chronically *S. aureus*-infected quarters compared with uninfected controls at 7, 14 and 21 d of involution and a lower apoptosis/proliferation ratio in stromal cells in *S. aureus*-infected quarters compared with uninfected controls, indicating increased stromal cell proliferation during the first three weeks of involution (Dallard et al., 2008). The increase in protein expression of TGF- β 1 observed in cows with chronic *S. aureus* mastitis in the present study may serve as a mechanism to ameliorate tissue damage or contribute to cellular repair mechanisms or both.

Previous studies have demonstrated that the host immune response will vary in accordance with the *S. aureus* strain (Atalla et al., 2009; Kim et al., 2011). Kim et al. (2011) observed a notable increase in serum TGF- β 1 concentrations during the chronic phase of experimental infection with small colony variant (SCV) Heba 3231 strain of *S. aureus* (isolated from a cow with history of chronic mastitis) compared with Parent 3231 strain and Newbould 305 strain. Although molecular characterization of *S. aureus* isolates causing chronic IMI was beyond the scope of the present study,

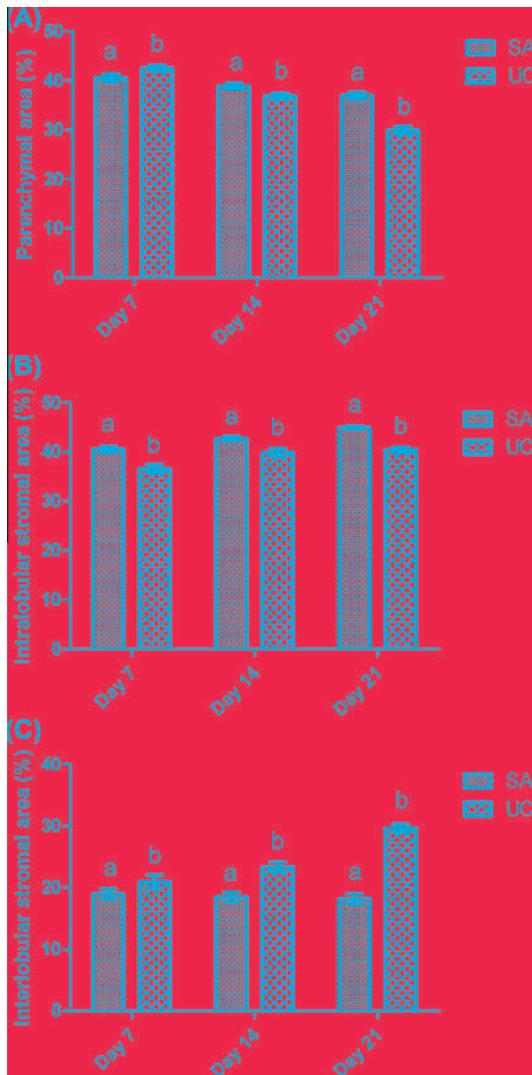


Fig. 5. Morphometric studies in *S. aureus*-infected mammary quarters (SA) and uninfected controls (UC). (A) Percentages of parenchyma, (B) intralobular stroma and (C) interlobular stroma at 7, 14 and 21 d after cessation of milking. Values represent the mean \pm standard error of the mean (SEM). Means (a–b) for each time period without a common letter differ ($P < 0.01$).

we observed a significant increase in protein expression of TGF- β 1 in mammary tissue of chronically-infected quarters compared with uninfected controls.

Both TGF- β 2 and TGF- β 3 mimic the effect of TGF- β 1 on the mammary gland (Robinson et al., 1991). While both TGF- β 1 and TGF- β 2 have been detected in bovine milk (Jin et al., 1991; Ginjala and Pakkanen, 1998), TGF- β 2 is the predominant form in milk (Jin et al., 1991; Chockalingam et al., 2005). Bannerman et al. (2006) demonstrated that *S. aureus* IMI during mid lactation evoked increased production of both TGF- β 1 and TGF- β 2 in milk. The three variants of TGF- β stimulate connective tissue formation and are chemotactic for fibroblasts (Akers, 2006). In the present study protein expression of TGF- β 2 was observed within the parenchymal and stromal components of the mammary tissue and was significantly higher in *S. aureus* infected than uninfected control quarters at every involution time evaluated. Moreover, percentages of IHCSA for TGF- β 3 were significantly higher in *S. aureus*-infected quarters than in uninfected controls at the three sampling times studied. Similar to TGF- β 1, the highest protein expression of TGF- β 3 in infected quarters was observed at 14 d of involution, period in which major morphological changes occur in mammary

parenchyma and stroma as reported in previous studies carried out both in healthy (Holst et al., 1987; Sordillo and Nickerson, 1988; Capuco et al., 1997) and *S. aureus*-infected mammary glands (Dallard et al., 2008).

Transforming growth factor- β mediates its biological effects through three high-affinity cell surface receptors, the TGF- β type 1, type 2, and type 3 receptors (also known as betaglycan), and the Smad family of transcription factors (Schmierer et al., 2007; Daly et al., 2008). The type 3 receptor has been shown to enhance both TGF- β binding to the type 2 receptor and TGF- β signaling (Plaut et al., 2003). Muniain and Plaut (1996) demonstrated that all three receptor types were present in mouse mammary tissue at different developmental stages; being type 3 receptor the most abundant. Blobe et al. (2001) defined that expression of the type 3 receptor is regulated at the protein level and established that increased level of type 3 receptor expression is sufficient to enhance TGF- β signaling. Consistent with previous reports (Plaut et al., 2003), we detected that the type 1 and 3 receptors were abundantly expressed and localized along the ductal epithelium and around alveoli. De Vries et al. (2010) observed stronger intensity for TGF- β R2 in the epithelial rather than in the stromal compartment in bovine mammary tissue. In this study, we observed diffuse, light staining of TGF- β R1 and TGF- β R3 in the intralobular and interlobular stroma. Stromal cells like fibroblasts showed moderate perinuclear cytoplasm staining consistent with those reported by Plaut et al. (2003). Moreover, we observed positive reaction in the cytoplasm of myoepithelial cells and immune cells (monocytes–macrophages, lymphocytes and plasma cells), which agrees with immunoreactivity observed for the different isoforms of TGF- β detected in the present study.

Protein expression of TGF- β R1 and TGF- β R3 was significantly affected by *S. aureus* infection and by time of sampling. At 7, 14 and 21 d of involution the percentages of IHCSA for TGF- β R1 and TGF- β R3 were significantly higher in *S. aureus*-infected quarters than in uninfected controls. The highest protein expression for TGF- β 1 and TGF- β 3 was observed at 14 d of involution in infected quarters, suggesting that these receptors could play a role in modulating the activity of TGF- β 1 and TGF- β 3 in chronically *S. aureus*-infected mammary glands during active involution. The increase in protein expression of TGF- β subfamily components observed in quarters infected with *S. aureus* relative to uninfected quarters throughout active involution are indicative of a sustained immune response. However, how this response contributes to eliminate the pathogen from the mammary gland is not clear, since IMI tend to persist during involution (Sordillo et al., 1989).

De Vries et al. (2011) demonstrated *in vivo* that short-term TGF- β 1 treatment of bovine mammary tissue increased the number of activated fibroblasts and increased the proliferation index of epithelial and fibroblast cells. In the present study, in *S. aureus*-infected quarters, alveoli and large ducts were surrounded by a continuous collagen structure in the zone adjacent to the epithelium, and an intense collagen staining within intralobular stroma was detected. The IHCSA percentages for collagen I were significantly higher in *S. aureus*-infected quarters than in uninfected quarters at every time of involution evaluated, with the highest expression at 21 d. This increase in collagen expression in infected quarters was coincident with a progressive increase in the percentages of intralobular stromal area. Capuco et al. (1997) found that hydroxyproline, a marker of collagen synthesis, increased parallel to increases in stromal area during mammary involution in dairy cows, suggesting that changes in stromal area during the dry period are a direct result of an increase in extracellular matrix synthesis rather than a change in stromal area by compression or variations in elasticity (Capuco et al., 1997). In accord with this hypothesis, in the present study, the increase in intralobular stromal area in chronically *S. aureus*-infected quarters during

involution was likely a result of the increased production of stromal proteins, since the protein expression of collagen I in the stroma augmented across the sampling period, paralleling the intralobular stromal area increase.

Histomorphometric studies have been carried out in mammary tissue from lactating and dry cows (Heald, 1979; Nickerson and Heald, 1981; Sordillo and Nickerson, 1988; Akers and Nickerson, 2011). Percentage of bovine mammary tissue area composed of epithelium and lumen decreases during gland involution while percentages of stromal area increases, reaching a peak between 14 and 25 d after milking ceases (Sordillo and Nickerson, 1988; Capuco et al., 1997). Changes in percentages of parenchymal and stromal area observed in this study in uninfected quarters were in accord with those described in naturally involuting mammary glands 7–21 d after drying off (Holst et al., 1987). The mammary tissue response to either natural or experimental *S. aureus* IMI in dairy cows has been quantified using histological and cytological techniques. In general, quarters with natural infections show reduced ability of secretory tissue to synthesize and secrete milk; namely, decreased percentages of tissue areas occupied by alveolar epithelium and lumina, and increased interalveolar stromal areas (Akers and Nickerson, 2011). Heald (1979) observed that mammary tissues from lactating cows inoculated with *S. aureus* exhibited less milk synthetic and secretory activity as evidenced by more interalveolar stroma, involuting alveolar epithelium and less alveolar luminal space compared with uninfected contralateral controls. Moreover, these changes were associated with replacement of secretory tissue by nonsecretory tissue (Nickerson and Heald, 1981). Trinidad et al. (1990) observed that tissues from quarters infected with *S. aureus* were less developed, exhibiting less alveolar epithelial and luminal areas and more interalveolar stroma compared with tissues from uninfected quarters. In the present study, the percentages of tissue area composed of parenchyma were significantly higher in infected quarters compared with healthy quarters; being this feature more pronounced at 14 and 21 d of involution. The increase in parenchyma percentages observed in *S. aureus*-infected quarters could be most likely related to the presence of alveoli with large and distended lumina due to secretory products stasis, luminal areas with large epithelial-like cells, hyaline-like material, as well as numerous neutrophils (data not shown). Thus, the increase in parenchyma percentages observed in the present study does not indicate greater secretory activity. In agreement with previous reports (Sordillo et al., 1989), the percentages of intralobular stroma were significantly higher in quarters with *S. aureus* mastitis than in uninfected quarters. In infected quarters the mean of percentages of interlobular stromal area remained unchanged throughout the sampling period and were significantly lower than those observed in healthy quarters.

5. Conclusions

Components of TGF- β subfamily were associated with the presence of abundant collagen I in intralobular connective tissue in mammary glands chronically infected with *S. aureus* during active involution. This increase in the stromal components in *S. aureus* mastitis could induce aberrant involution with increase in the intralobular stromal area and permanence of nonsecretory parenchymal tissue. The higher protein expression of three isoforms of TGF- β and type 1 and 3 receptors in chronic *S. aureus* mastitis appears to be an essential response for limiting the scope of inflammation and injury to the host. Increased protein expression of the TGF- β subfamily components in quarters infected with *S. aureus* compared with uninfected quarters were indicative of a sustained response of host immune system during active involution.

Further studies are granted to define *S. aureus* components involved in evasion of these host responses to favour persistence within mammary tissue during this period.

Acknowledgements

This work was supported by Argentine National Agency for the Promotion of Science and Technology (ANPCyT) (PICT 0872/2010), National Institute of Agricultural Technology (INTA - AESA 52:203992) and Asociación Cooperadora INTA Rafaela. The authors want to express their appreciation to Mr. M. Marín and O. Warnke for abattoir samples collection.

References

- Akers, R.M., Nickerson, S.C., 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16, 275–289.
- Akers, R.M., 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 1222–1234.
- Annen, E.L., Fitzgerald, A.C., Gentry, P.C., McGuire, M.A., Capuco, A.V., Baumgard, L.H., Collier, R.J., 2007. Effect of continuous milking and bovine somatotropin supplementation on mammary epithelial cell turnover. *Journal of Dairy Science* 90, 165–183.
- Ashcroft, G.S., 1999. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microbes and Infection* 1, 1275–1282.
- Atalla, H., Gyles, C., Wilkie, B., Leslie, K., Mallard, B., 2009. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. *Veterinary Microbiology* 137, 326–334.
- Bannerman, D.D., Paape, M.J., Chockalingam, A., 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor- α , β 1, and β 2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112, 309–315.
- Bannerman, D.D., Paape, M.J., Lee, J.W., Zhao, X., Hope, J.C., Rainard, P., 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 463–472.
- Bannerman, D.D., 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science* 87, 10–25.
- Baravalle, C., Dallard, B.E., Cadoche, M.C., Pereyra, E.A., Neder, V.E., Ortega, H.H., Calvino, L.F., 2011. Proinflammatory cytokines and CD14 expression in mammary tissue of cows following intramammary inoculation of *Panax ginseng* at drying off. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144, 52–60.
- Blobe, G.C., Xuedong, L., Fang, S.J., How, T., Lodish, H.F., 2001. A novel mechanism for regulating transforming growth factor- β signaling. *Journal of Biological Chemistry* 276, 39608–39617.
- Bonewald, L.F., 1999. Regulation and regulatory activities of transforming growth factor- β . *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 9, 33–44.
- Capuco, A.V., Akers, R.M., Smith, J.J., 1997. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. *Journal of Dairy Science* 80, 477–487.
- Capuco, A.V., Akers, R.M., 1999. Mammary involution in dairy animals. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 4, 137–144.
- Chockalingam, A., Paape, M.J., Bannerman, D.D., 2005. Increased milk levels of transforming growth factor- α , β 1, and β 2 during *Escherichia coli*-induced Mastitis. *Journal of Dairy Science* 88, 1986–1993.
- Dallard, B.E., Baravalle, C., Ortega, H.H., Ruffino, V., Heffel, S., Calvino, L.F., 2008. Effect of a biological response modifier on cellular death mechanisms at drying off. *Journal of Dairy Research* 75, 167–175.
- Dallard, B.E., Pujato, S., Baravalle, C., Pereyra, E.A., Rey, F., Renna, M.S., Calvino, L.F., 2013. Intramammary infusion of *Panax ginseng* extract in the bovine mammary gland at cessation of milking modifies components of the insulin-like growth factor system during involution. *Research in Veterinary Science* 49, 462–470.
- Dallard, B.E., Baravalle, C., Ortega, H.H., Tumini, M., Canavesio, V.R., Neder, V.E., Calvino, L.F., 2009. Effect of a biological response modifier on expression of CD14 receptor and tumor necrosis factor- α in *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands at drying off. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 132, 237–242.
- Dallard, B.E., Ortega, H.H., Iguazuza, I.A., Salvetti, N.R., Quaino, O.A., Calvino, L.F., 2010. The effect of a single intramammary infusion of a biological response modifier in cows at drying off. *Veterinary Research Communications* 34, 519–532.
- Daly, A.C., Randall, R.A., Hill, C.S., 2008. Transforming growth factor- β induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Molecular and Cellular Biology* 28, 6889–6902.

- Daniel, C.W., Robinson, S., Silberstein, G.B., 2001. The transforming growth factors- β in development and functional differentiation of the mouse mammary gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 501, 61–70.
- De Vries, L.D., Casey, T., Dover, H., VandeHaar, M.J., Plaut, K., 2011. Effects of transforming growth factor- β on mammary remodeling during the dry period of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94, 6036–6046.
- De Vries, L.D., Dover, H., Casey, T., VandeHaar, M.J., Plaut, K., 2010. Characterization of mammary stromal remodeling during the dry period. *Journal of Dairy Science* 93, 2433–2443.
- Eberhart, R.J., 1986. Management of dry cow to reduce mastitis. *Journal of Dairy Science* 69, 1721–1729.
- Fargeas, C., Wu, C.Y., Nakajima, T., Cox, D., Nutman, T., Delespesse, G., 1992. Differential effect of transforming growth factor- β on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 22, 2173–2176.
- Federation of Animal Sciences Societies (FASS), 1999. *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. First Revised Edition, p. 129.
- Flanders, K.C., Wakefield, L.M., 2009. Transforming growth factor- β s and mammary gland involution; functional roles and implications for cancer progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14, 131–144.
- Gajewska, M., Motyl, T., 2004. IGF-binding proteins mediate TGF- β 1-induced apoptosis in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 139, 65–75.
- Gajewska, M., Gajkowska, B., Motyl, T., 2005. Apoptosis and autophagy induced by TGF- β 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 143–157.
- Ginjala, V., Pakkanen, R., 1998. Determination of transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor (IGF-1) in bovine colostrum samples. *Journal of Immunology* 19, 195–207.
- Heald, C.W., 1979. Morphometric study of experimentally induced *Staphylococcus bovis* mastitis in the cow. *American Journal of Veterinary Research* 40, 1294–1298.
- Holst, B.D., Hurley, W.L., Nelson, D.R., 1987. Involution of the bovine mammary gland: histological and ultrastructural changes. *Journal of Dairy Science* 70, 935–944.
- Jeruss, J.S., Santiago, J.Y., Woodruff, T.K., 2003. Localization of activin and inhibin subunits, receptors and SMADs in the mouse mammary gland. *Molecular Cell Endocrinology* 203, 185–196.
- Jin, Y., Cox, D.A., Knecht, R., Raschdorf, F., Cerletti, N., 1991. Separation, purification, and sequence identification of TGF- β 1 and TGF- β 2 from bovine milk. *Journal of Protein Chemistry* 10, 565–575.
- Kim, Y., Atalla, H., Mallard, B., Robert, C., Karrow, N., 2011. Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research* 7, 51–63.
- Kingsley, D.M., 1994. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development* 8, 133–146.
- Kolek, O., Gajkowska, B., Godlewski, M.M., Motyl, T., 2003. Antiproliferative and apoptotic effect of TGF- β 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 134, 417–430.
- Letterio, J.J., Roberts, A.B., 1998. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annual Review of Immunology* 16, 137–161.
- Manickam, R., Pena, R.N., Whitelaw, C.B., 2008. Mammary gland differentiation inversely correlates with GDF-8 expression. *Molecular Reproduction and Development* 75, 1783–1788.
- Munian, S., Plaut, K., 1996. Developmental regulation of transforming growth factor- β 1 receptors in mouse mammary tissue. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 10, A757.
- Musters, S., Coughlan, K., McFadden, T., Maple, R., Mulvey, T., Plaut, K., 2004. Exogenous TGF- β 1 promotes stromal development in the heifer mammary gland. *Journal of Dairy Science* 87, 896–904.
- Nagahata, H., Kawai, H., Higuchi, H., Kawai, K., Yayou, K., Chang, C.J., 2011. Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Veterinary Medical Science* 73, 885–894.
- Nickerson, S.C., Heald, C.W., 1981. Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *American Journal of Veterinary Research* 42, 1351–1355.
- Oliver, S.P., Gonzalez, R.N., Hogan, J.S., Jayarao, B.M., Owens, W.E., 2004. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*, 4th edition. National Mastitis Council, Verona, WI, USA.
- Oliver, S.P., Sordillo, L.M., 1989. Approaches to the manipulation of mammary involution. *Journal of Dairy Science* 72, 1647–1664.
- Phippard, D.J., Weber-Hall, S.J., Sharpe, P.T., Naylor, M.S., Jayatalake, H., Maas, R., et al., 1996. Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during foetal and postnatal mammary gland development. *Development* 122, 2729–2737.
- Plath, A., Einspanier, R., Peters, F., Sinowatz, F., Schams, D., 1997. Expression of transforming growth factors- α and β 1 messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation. *Journal of Endocrinology* 155, 501–511.
- Plaut, K., Dean, A.J., Patnode, T.A., Casey, T.M., 2003. Effect of transforming growth factor- β on mammary development. *Journal of Dairy Science* 86, 16–27.
- Remond, B., Rouel, J., Pinson, N., Jabet, S., 1997. An attempt to omit the dry period over three consecutive lactations in dairy cows. *Annals of Zootechnology* 46, 399–734.
- Rinaldi, M., Li, R.W., Bannerman, D.D., Daniels, K.M., Evock-Clover, C., Silva, M.V., Paape, M.J., Van Ryssen, B., Burvenich, C., Capuco, A.V., 2010. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *Escherichia coli* mastitis. *Functional & Integrative Genomics* 10, 21–38.
- Riollet, C., Rainard, P., Poutrel, B., 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Dairy Science* 84, 1077–1084.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Besser, T.E., 1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 3217–3219.
- Robinson, S.D., Silberstein, G.B., Roberts, A.B., Flanders, K.C., Daniel, C.W., 1991. Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor- β isoforms in mouse mammary gland development. *Development* 113, 867–878.
- Schmierer, B., Hill, C.S., 2007. TGF- β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 970–982.
- Schukken, Y.H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.J., Sipka, A., Smith, D.G., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R.N., Seyfert, H.M., 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 15, 270–289.
- Sordillo, L.M., Nickerson, S.C., 1988. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *American Journal of Veterinary Research* 49, 1112–1120.
- Sordillo, L.M., Nickerson, S.C., Akers, R.M., 1989. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: Relationship with bovine mammary structure and function. *Journal of Dairy Science* 72, 228–240.
- Sorensen, M.T., Norgaard, J.V., Theil, P.K., Vestergaard, M., Sejrsen, K., 2006. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 4632–4639.
- Trinidad, P., Nickerson, S.C., Adkinson, R.W., 1990. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 73, 639–647.
- Turk, R., Piras, C., Kovačić, M., Samardžija, M., Ahmed, H., De Canio, M., Urbani, A., Meštrić, Z.F., Soggiu, A., Bonizzi, L., Roncada, P., 2012. Proteomics of inflammatory and oxidative stress response in cows with subclinical and clinical mastitis. *Journal of Proteomics* 75, 4412–4428.
- Wellnitz, O., Bruckmaier, R.M., 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal* 192, 148–152.
- Zarzynska, J., Motyl, T., 2005. Dissimilar effects of LY 294002 and PD 098059 in IGF-1-mediated inhibition of TGF- β 1 expression and apoptosis in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 181–193.
- Zarzynska, J., Gajkowska, B., Wojewodzka, U., Dymnicki, E., Motyl, T., 2007. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland is accompanied by up-regulation of TGF- β 1 and suppression of somatotrophic pathway. *Polish Journal of Veterinary Science* 10, 1–9.
- Zecconi, A., Calvino, L., Fox, L., 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin of International Dairy Federation* 408, 1–36.