

INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR EN LAS INFECCIONES INTRAMAMARIAS

DALLARD, B. E¹

RESUMEN

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria causada normalmente por infección microbiana y está reconocida como la enfermedad más costosa del ganado lechero. El daño en el tejido mamario puede estar inducido por dos mecanismos principales, necrosis o apoptosis. Estas dos formas de muerte de las células pueden ser distinguidas por cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares en las células agonizantes. Tanto los factores bacterianos como las reacciones inmunes del hospedador contribuyen al daño del tejido epitelial. La mastitis se caracteriza por un influxo de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), dentro de la glándula mamaria. La migración de células inmunes, la ruptura de la barrera sangre-leche y el daño en la membrana basal conducen a la muerte de la célula epitelial. El esclarecimiento de los cambios bioquímicos y celulares que ocurren en la glándula durante la mastitis permitirá proponer medidas para manipular las funciones mamarias a los efectos de minimizar el daño en el tejido.

Palabras clave: bovino, glándula mamaria, mastitis, apoptosis, daño tisular.

SUMMARY

Cellular death induction in mammary infections.

Mastitis is an inflammatory reaction of the mammary gland that is usually due to a microbial infection and is recognized as the most costly disease in dairy cattle. The mammary tissue damage has been shown to be induced by either apoptosis or necrosis. These two distinct types of cell death can be distinguished by morphological, biochemical and molecular changes in dying cells. Both bacterial factors and host immune reactions contribute to epithelial tissue damage. Mastitis is characterized by an influx of somatic cells, primarily polymorphonuclear neutrophils (PMNs), into the mammary gland. The immune cells migrating into the mammary gland, breakdown of the blood-milk barrier and damage of the extracellular matrix can lead to death of epithelial cells. Understanding the biochemical and cellular changes that occur in the gland during mastitis will ultimately lead to means of manipulating mammary functions to minimize the damage from mastitis.

Key words: bovine, mammary gland, mastitis, apoptosis, tissue damage.

1.- Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: bdallard@fcv.unl.edu.ar
Manuscrito recibido el 17 de octubre de 2007 y aceptado para su publicación el 21 de noviembre de 2007.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad con alta prevalencia en los sistemas productivos lecheros, especialmente cuando los animales sufren estrés y es reconocida como la enfermedad más costosa del ganado lechero (Kehrli & Harp, 2001). Las pérdidas provienen de la disminución de la producción (Beck *et al.*, 1992; Lescourret & Coulon, 1994), el tratamiento antibiótico, el descarte de la leche o la disminución del precio de la misma, el incremento del tiempo y trabajo de ordeño, el secado prematuro, la pérdida de la condición corporal, el alargamiento del intervalo parto-parto, hasta la muerte de animales (Mol, 2000).

La mastitis subclínica es la principal forma de mastitis en los sistemas productivos lecheros modernos, afectando del 20 al 50 % de las vacas (Wilson *et al.*, 1997; Pitkala *et al.*, 2004). Los costos de las pérdidas ocasionadas por la mastitis subclínicas son muy difíciles de cuantificar, pero muchos expertos coinciden en que los costos promedios son mayores que los causados por la mastitis clínica. Asumiendo una prevalencia del 45% de mastitis subclínica en un rodeo, los costos de las pérdidas han sido estimados en rangos de U\$S 180 a 320 por animal (Wilson *et al.*, 1997). Un 70 % de estos se han asociado con reducción en la producción de leche y una gran parte provienen de daños irreversibles en el tejido mamario (Oliver & Calvinho, 1995). Aunque los antibióticos han sido ampliamente utilizados para tratar las infecciones intramamarias, éstos no protegen en forma directa contra el daño tisular inducido.

Esta revisión es una complicación de los hallazgos más relevantes relacionados con las lesiones en el tejido mamario bovino durante la mastitis. Se describen los aspectos moleculares relacionados con la muerte de

las células epiteliales alveolares y la respuesta del hospedador.

ASPECTOS GENERALES A CERCA DE LA MASTITIS

La susceptibilidad de la glándula mamaria bovina a las nuevas infecciones intramamarias (IIM) aumenta marcadamente durante la involución temprana y durante el parto (Oliver & Sordillo, 1989). Durante la involución temprana de la glándula mamaria, comienzan a aumentar significativamente algunas proteínas defensivas, como la lactoferrina e inmunoglobulinas, así como células del sistema inmune; sin embargo, la aparición de nuevas IIM se ve favorecida en esta etapa (Oliver & Mitchel, 1983). Esto se debe fundamentalmente al gran volumen de leche acumulado, la falta de remoción de la leche y a la escasa concentración de los sistemas defensivos durante los primeros días de este período (Oliver & Sordillo, 1989). Durante el parto, el estrés producido por la preñez y el parto estimula la producción de una variedad de hormonas que tienen importantes efectos sobre la respuesta inmune. Un grupo de estas hormonas de estrés que regulan la función inmune son conocidas como corticoesteroides. Dentro de ellos, los glucocorticoides (dexametasona) pueden disminuir el número, la distribución y función de los leucocitos en sangre bovina (Waller, 2000).

Los patógenos comúnmente aislados de leches con mastitis pueden ser clasificados como microorganismos no contagiosos (la mayoría ambientales) y contagiosos. Los primeros incluyen *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* sp., *Escherichia coli* (*E. coli*) y especies de *Staphylococcus* coagulasa negativo, mientras que los segundos incluyen a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Streptococcus agalactiae* (Kerro

Dego *et al.*, 2002).

La glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa que pueden ser separados en dos categorías diferentes: inmunidad innata e inmunidad específica. La primera de ellas, también conocida como natural o no específica, es el sistema de defensa predominante durante el estadio temprano de la infección. La respuesta no específica está presente o se activa rápidamente en el sitio de infección por numerosos estímulos, pero no aumenta con la exposición repetida al mismo antígeno. Si el mecanismo de defensa no específico funciona adecuadamente, muchos patógenos son eliminados rápidamente y antes que la respuesta inmune específica se active. La eliminación rápida del patógeno con frecuencia no resulta en cambios en la calidad de la leche o producción. Las defensas no específicas o innatas de la glándula mamaria están mediadas por las barreras físicas del pezón, macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK) y ciertos factores solubles (Sordillo & 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 activado. La respuesta inmune adquirida reconoce determinantes antigénicos específicos del patógeno. Si el hospedador debe enfrentar al antígeno más de una vez, un estado elevado de reactividad inmune puede ocurrir como consecuencia de la memoria inmunológica. En comparación con la primera exposición al antígeno bacteriano, la respuesta de memoria puede ser mucho más rápida, considerablemente más fuerte, más duradera y con frecuencia más efectiva en remover o eliminar al patógeno. Los protocolos de vacunación se basan en los rasgos únicos de la respuesta inmune específica (Sordillo & Streicher, 2002).

El canal del pezón es considerado la pri-

mera línea de defensa contra la mastitis, ya que ésta es la ruta a través de la cual invaden los patógenos. Está cubierto con queratina la cual es crucial para mantener la función de barrera física y química contra los patógenos (Capuco *et al.*, 1992). Las bacterias pueden escapar a los mecanismos de defensa naturales por multiplicación a lo largo del canal del pezón (especialmente después del ordeño), o por propulsión dentro de la cisterna de la glándula por fluctuaciones en el vacío de la máquina de ordeñar. La infección se establece luego de que la bacteria gana la entrada a la glándula mamaria vía el canal del pezón. Luego de que la bacteria supera las defensas anatómicas debe evadir los mecanismos de defensa celular y humoral de la glándula mamaria para que la infección aparezca (Sordillo & Streicher, 2002)

Si la infección no es eliminada, los niveles bacterianos en la glándula mamaria aumentan hasta un punto donde sus toxinas o reacción inducida en el huésped comienzan a dañar el epitelio mamario. Si la infección persiste, el número de células somáticas en leche se incrementa y concomitantemente el daño en el tejido empeora considerablemente. El alvéolo, en el lobulillo mamario, comienza a perder su integridad estructural y se rompe la llamada barrera sangre-leche. Esto lleva a que el fluido extra celular se acumule en la glándula y se mezcle con la leche. En este punto comienzan a ocurrir cambios visibles en la leche y en la ubre. Estos cambios incluyen tumefacción externa, enrojecimiento de la glándula y coágulos en la leche. En resumen, las células epiteliales mamarias pueden ser dañadas durante la IIM por: 1) liberación de una gama de productos celulares y extracelulares producto de los patógenos bacterianos; 2) liberación de enzimas lisosomales y productos oxidativos provenientes de los fagocitos durante la fagocitosis de los organismos invasores y 3) liberación de

proteasas y citoquinas durante la respuesta inmune (Zhao & Lacasse, 2007).

APOPTOSIS Y NECROSIS

Se han descrito dos formas de muerte celular: necrosis y apoptosis. Las mismas se distinguen por los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que ocurren en la célula agonizante (Fink & Cookson, 2005).

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). El proceso de apoptosis fue inicialmente distinguido de la necrosis en base a la ultraestructura celular (Kerr *et al.*, 1972).

La apoptosis es una forma de muerte celular ATP dependiente, caracterizada morfológicamente por condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y disminución del tamaño de la célula (Granville *et al.*, 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 (Sladek & Rysanek, 2000).

Los cambios nucleares son los rasgos más característicos de la apoptosis: la cromatina se condensa en la periferia por debajo de la membrana nuclear en masas densas bien definidas. Posteriormente, se produce la fragmentación del ADN nuclear en múltiplos de 200 pares de bases (pb) debido a la activación de una endonucleasa sensible al Ca²⁺ que rompe el ADN internucleosomal. Luego, se produce el desensamblaje y formación de vesículas rodeadas de membrana denominadas “cuerpos apoptóticos” que se

componen de citoplasma y orgánulos muy agrupados, pudiendo contener también fragmentos nucleares (Kanzler & Galle, 2000). Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células sanas adyacentes del parénquima o por macrófagos, donde se degradan con rapidez dentro de los lisosomas, gracias a su actividad enzimática. Seguidamente, las células adyacentes migran o proliferan reemplazando así el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida (Cohen, 1993).

Bioquímicamente, la apoptosis se caracteriza por activación de las caspasas, proteasas altamente específicas que activan sustratos intracelulares. Se han descrito dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7). Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. 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 (Chang & Yang, 2000).

La apariencia escalonada del ADN oligonucleosomal en geles de agarosa ha sido extensamente utilizada para detectar apoptosis. El desarrollo de la técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling*) permitió la marcación enzimática de la ruptura de las cadenas de ADN y la detección de apoptosis en los tejidos. Además, la pérdida de la asimetría en los fosfolípidos de las membranas celulares llevó a la utilización de anexina-V como marcador de apoptosis en suspensiones de células. Esta proteína se une al fosfolípido fosfatidil serina, el cual queda expuesto en la cara externa de la membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. Por otra

parte, caspasas específicas o el clivaje de sustratos específicos de las caspasas han sido también explorados para detectar apoptosis (Zhao & Lacasse, 2007).

En contraste con la apoptosis, la muerte por necrosis es un proceso independiente de energía que implica una hinchazón de la célula y de sus orgánulos intracelulares, con lo que esta 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 & Joris, 1995, Reed, 2000).

La aparente claridad de las diferencias entre apoptosis y necrosis muchas veces ha sido sobre simplificada. Por ejemplo, los cuerpos apoptóticos, así como los restos de fragmentos celulares si no son rápidamente removidos por fagocitos o células vecinas, finalmente aumentarán de tamaño hasta lisarse. Este proceso se conoce como necrosis secundaria. Además, la interconexión positiva o negativa entre autofagia y necrosis agrega complejidad adicional a la investigación de la apoptosis (Gozuacik & Kimchi, 2004).

La citotoxicidad también ha sido comúnmente usada en la literatura para describir el daño del tejido mamario, pero no como un mecanismo celular específico, sino como indicador de las propiedades de un compuesto químico o mediador en la muerte celular. Existen muchas pruebas disponibles para medir citotoxicidad en un tejido, y muchas de ellas se basan en el incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática o de la absorción de colorantes por parte de

las células muertas o agonizantes. Los resultados de las pruebas de citotoxicidad varían considerablemente según la metodología utilizada (Fellows & O'Donovan 2007). En general, los métodos para medir citotoxicidad pueden ser usados para detectar necrosis y apoptosis en estadio avanzado, pero no en un estadio temprano. Específicamente, en estudios en glándula mamaria bovina, la actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa y N-acetil-D-glucosaminidasa (NAGasa) ha sido usada comúnmente como marcador de daño tisular. La enzima lactato deshidrogenasa se encuentra presente en forma estable en el citoplasma de todas las células y cuando la membrana celular se daña, se libera rápidamente al exterior. La NAGasa se localiza en el interior de los lisosomas en células epiteliales mamarias y es liberada cuando las células se dañan (Kitchen *et al.*, 1980).

CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS DURANTE LA MASTITIS CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Análisis histológicos han sido extensamente usados desde 1970 y continúan siendo útiles en la actualidad para evaluar el daño en el tejido secretor de la glándula mamaria bovina causado por la mastitis. Benites *et al.* (2002) examinaron los cambios histopatológicos causados por microorganismos en el parénquima mamario de vacas lecheras. En ese estudio, de todas las muestras de las cuales fueron aislados microorganismos, sólo el 3.1% no mostró cambios histológicos. El restante 96.9% de las muestras mostraron respuesta inflamatoria (edema, daño de las células epiteliales mamarias, infiltración de PMN y/o procesos de reparación tisular). Estos resultados indican claramente que la

presencia de microorganismos está asociada con daño tisular.

Uno de los tipos más comunes de mastitis crónica es la causada por *S. aureus*. La respuesta histopatológica del tejido lactante en mastitis naturales o experimentales causadas por *S. aureus* fue extensivamente estudiada durante 1970 y 1980. Chandler & Reid (1973) examinaron muestras de parén-quima mamario de vacas lactantes infectadas naturalmente con *S. aureus* y reportaron una masiva infiltración de PMN y necrosis del tejido secretorio. Además, Heald (1979) demostró que el tejido mamario de vacas lactantes inoculadas con *S. aureus* presentaba menor síntesis y secreción de leche, lo que fue evidenciado por más estroma interalveolar y epitelio alveolar involucionado y menos espacios lumenales alveolares comparado con controles contralaterales no infectados. Además, estos cambios se asociaron con reemplazo del tejido secretorio por tejido no secretorio (Nickerson & Heald, 1981). En forma similar, un estudio con vacas secas, reveló que cuartos infectados con *S. aureus* mostraban un mayor grado de involución mamaria con mayor proporción de estroma interalveolar y menor proporción de lúmenes alveolares comparados con cuartos no infectados (Sordillo & Nickerson, 1988).

Finalmente, un estudio llevado a cabo en hembras bovinas por Trinidad *et al.* (1990) mostró que glándulas mamarias infectadas con *S. aureus* también exhibieron menos epitelio alveolar y lúmenes alveolares pero mayor estroma interalveolar que los controles. En base a estos resultados, se ha concluido que la infección por *S. aureus* causa necrosis del tejido secretor y el tejido secretorio dañado es reemplazado por tejido no secretor.

En contraste con lo observado en los estudios anteriores, resultados recientes obtenidos sobre glándulas mamarias crónicamente

infectadas con *S. aureus* y no infectadas a los 7, 14 y 21 días la involución, mostraron que los porcentaje de área ocupada por estroma en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* fueron similares a los hallados en cuartos no infectados durante todos los periodos evaluados con una firme tendencia a aumentar con el progreso de la involución. Las diferencias halladas con respecto a los porcentajes de estroma reportados por otros autores podrían estar relacionadas con la naturaleza de la infección de la glándula mamaria. En los estudios recientes, las vacas utilizadas estaban crónicamente infectadas con *S. aureus*, mientras que en la mayoría de los estudios mencionados las infecciones fueron experimentales (Nicker-son & Heald, 1981; Sordillo & Nickerson, 1988; Trinidad *et al.*, 1990). Además, las diferencias podrían estar relacionadas con la metodología empleada en el análisis de las imágenes de los cortes histológicos ya que en la actualidad se emplean programas computarizados que permiten, sin desvalorizar los métodos manuales de análisis, obtener una mayor objetividad en los resultados (Dallard, 2007).

El análisis histopatológico de las muestras de tejido mamario provenientes de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus*, reveló dos tipos de lesiones: focales y difusas, distribuidas por todo el parénquima mamario, con pérdida de la arquitectura de los alvéolos y conductos mamarios, necrosis de las células epiteliales y reemplazo por gran cantidad de linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y en menor número eosinófilos y neutrófilos. Se observaron abundantes macrófagos con núcleos globosos desplazados hacia la periferia y citoplasmas vacuolados. Algunos alvéolos mostraron sus lúmenes reducidos. Se observaron zonas de hiperplasia de la pared alveolar y de los conductos excretores compatibles con lesiones crónicas. Por otra parte, en los cuartos

mamarios no infectados no se detectaron lesiones aparentes (Dallard, 2007).

APOPTOSIS DURANTE LA MASTITIS

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

La internalización de *S. aureus* requiere de la interacción específica entre proteínas de unión a fibronectina y la célula del hospedador, probablemente seguida por una señal de traducción que lleva finalmente a la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedadora (Dziewanowska *et al.*, 1999). El examen con microscopía electrónica de células infectadas reveló que la bacteria es internalizada vía un mecanismo que involucra la formación de pseudópodos por la membrana y luego escapa dentro del citoplasma debido a la lisis de la membrana del endosoma. Dos horas después, las células muestran desprendimiento de la matriz, plegamiento de sus membranas y vacuolización del citoplasma; todo lo cual es indicativo de que las células padecen muerte celular programada o apoptosis (Bayles *et*

al., 1998). La internalización de *S. aureus* por parte de la célula huésped es un componente importante de la mastitis y de otras enfermedades causadas por esta bacteria, y este mecanismo podría proveer protección en contra de las defensas del hospedador y tratamientos antibióticos.

La apoptosis es el rasgo clave del desarrollo y función de la glándula mamaria y es un proceso crítico para la renovación de las células epiteliales alveolares secretoras de leche durante la lactancia e involución (Capuco & Akers, 1999; Capuco *et al.*, 2003). No obstante, evidencias conclusivas y directas sobre la participación de la apoptosis durante la mastitis han sido estipuladas (Long *et al.*, 2001). La inducción de apoptosis por patógenos bacterianos es un proceso celular que está bien establecido o consolidado (Weinrauch & Zychlinsky, 1999).

La relación entre mastitis y apoptosis de las células mamarias fue evaluada *in vivo* después de la inyección de *E. coli* dentro de la glándula mamaria en vacas Holstein en lactación (Long *et al.*, 2001). El índice de apoptosis fue significativamente mayor en tejido con mastitis comparado con controles no infectados. Estos resultados concuerdan con los hallados en un estudio reciente, donde la apoptosis de las células epiteliales y estromales fue significativamente mayor al día 21 del secado en cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* que en no infectados (Dallard, 2007). En estudios previos (Long *et al.*, 2001) la infección despertó un incremento en la expresión de genes proapoptóticos (Bax e IL-1b-enzima convertidora), mientras que la expresión de genes antiapoptóticos (Bcl-2) se vio disminuida. Resultados similares a los hallados en infecciones experimentales con *E. coli* fueron obtenidos en un estudio reciente, ya que los porcentajes de área inmunomarcada para Bax fueron significativamente mayores

en cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* que en cuartos sanos a los 7, 14 y 21 días del secado (Dallard, 2007).

Long *et al.* (2001) observaron un incremento en la inducción de metaloproteinasa-9 de la matriz, estromelina-1 y activador de plasminógeno tipo uroquinasa, lo cual indica degradación de la matriz extracelular y pérdida de células durante la mastitis. Además, el índice de expresión de Ki-67 sugirió que la mastitis también incrementa la proliferación celular, tal vez como un mecanismo reparador. Estos datos concuerdan con nuestros hallazgos en donde los porcentajes de marcación para PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y Ki-67 en cuartos crónicamente infectados, con *S. aureus* fueron significativamente mayores a los observados en cuartos sanos (Dallard *et al.*, 2007, Dallard, 2007).

La inducción de mastitis bovina por *Streptococcus agalactiae* incrementa la expresión de marcadores de apoptosis como RTPM-2 (Sheffield, 1997) y se ha observado que *S. aureus* induce apoptosis de una línea celular epitelial mamaria bovina, células MAC-T (Bayles *et al.*, 1998, Wesson *et al.*, 1998). El mecanismo por el cual *S. aureus* induce apoptosis de las células epiteliales mamarias *in vitro*, involucra la activación de la caspasa-8 y -3, dos componentes clave de la cascada proteolítica que lleva a la apoptosis (Wesson *et al.*, 2000). En cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* no se observaron diferencias en los porcentajes de células epiteliales marcadas para caspasa-3 activa con respecto a los no infectados, sin embargo, en las células estromales los porcentajes de marcación fueron significativamente mayores en infectados que en no infectados a los 7, 14 y 21 días de la involución. Esto sugiere que el mecanismo por el cual *S. aureus* induce apoptosis de las células del estroma mamario

in vivo, en concordancia con los trabajos *in vitro*, involucra la activación de la caspasa-3 (Dallard, 2007).

La infección de células MAC-T con *S. aureus* causa un incremento significativo en la expresión de citoquinas proinflamatorias como factor necrosante de tumores- α (TNF- α) e interleukina-1 β (IL-1 β), mientras que la expresión de citoquinas antiinflamatorias como factor transformante del crecimiento- β (TGF- β) e IL-8 permanece inalterada (Wesson *et al.*, 2000). En concordancia, en glándulas crónicamente infectadas con *S. aureus* los porcentajes de inmunomarcación para TNF- α fueron significativamente mayores a los hallados en cuartos sanos (Dallard, 2007).

CONCLUSIONES

A pesar de los considerables avances en el entendimiento de la patogénesis de la mastitis bovina, la enfermedad continúa siendo un problema económico importante en la industria lechera del mundo. La solución ideal al problema de la mastitis es prevenir que esta ocurra. Sin embargo, aún con los mejores programas de prevención y control la mastitis continúa ocurriendo y los intentos por reducir las pérdidas económicas causadas por la misma son a veces un desafío desalentador. Aunque está aceptado que los neutrófilos, las bacterias y las proteasas y citoquinas contribuyen al daño del tejido mamario durante la mastitis, muchos detalles importantes todavía son desconocidos. El daño del tejido mamario durante la IIM está probablemente subestimado, debido a la falta de métodos de detección sensibles y no invasivos. La detección temprana de la IIM es un requisito previo para la iniciación de cualquier medida de intervención que minimice el daño del tejido mamario.

Los mecanismos responsables del daño en el epitelio mamario y en el tejido durante la mastitis todavía no están totalmente entendidos, pero incluyen dos mecanismos principales, necrosis y apoptosis. El esclarecimiento de los cambios bioquímicos y celulares que ocurren en la glándula durante la mastitis aportará mayor información para manipular las funciones mamarias y así minimizar el daño en el tejido. Además del uso de antibióticos para tratar las mastitis, otras medidas para la reducción del daño en el tejido pueden ser de valor para disminuir de manera eficaz las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- BAYLES, K.W.; C.A. WESSON; L.E. LIOU; L.K. FOX; G.A. BOHACH & W.R. TRUMBLE.** 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66:336-342.
- BECK, H.; W. WISE & F. DODD.** 1992. Cost benefits analysis of bovine mastitis in the UK. *J. Dairy Res.* 59:449-460.
- BENITES N. R.; J. L. GUERRA; P.A. MELVILLE & E.O. DA COSTA.** 2002. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of a spontaneous occurrence. *J. Vet. Med. B* 49:366-370.
- CAPUCO, A. V. & R. M. AKERS.** 1999. Mammary involution in dairy animals. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4:137-144.
- CAPUCO, A. V.; S. A. BRIGHT; J. W. PANKEY; D. L. WOOD; R. H. MILLER & J. BITMAN.** 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 75:2126-2130.
- CAPUCO, A. V.; S.E. ELLIS; S.A. HALE; E. LONG; R.A. ERDMAN; X. ZHAO & M.J. PAAPE.** 2003. Lactation Persistency: Insights from Mammary Cell Proliferation Studies. *J. Anim. Sci.* 81:18-31.
- CAPUCO, A.V.; M.J. PAAPE & S.C. NICKERSON.** 1986. *In vitro* study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.* 47:663-668.
- CHANDLER, R. L. & I. M. REID.** 1973. Ultrastructure and associated observations in clinical cases of mastitis in cattle. *J. Comp. Pathol.* 83:233-241.
- CHANG, H.Y. & X. YANG.** 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:821-846.
- COHEN, J. J.** 1993. Overview: mechanisms of apoptosis. *Immunol. Today.* 14:126-130.
- DALLARD, B. E.** 2007. Estudio histofisiológico del efecto de un agente inmunomodulador intramamario en la involución de la glándula mamaria bovina. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.
- DALLARD, B. E.; V. RUFFINO; S. HEFFEL & L. F. CALVINHO.** 2007. Effect of a biological response modifier on expression of growth factors and cellular proliferation at drying off. *J Dairy Sci.* 90:2229-2240.
- DZIEWANOWSKA, K.; J.M. PATTI; C.F. DEOBALD; K.W. BAYLES; W.R. TRUMBLE & G.A. BOHACH.** 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67:4673-4678.
- FELLOWS, M.D. & M.R. O'DONOVAN.** 2007. Cytotoxicity in cultured mammalian cells is a function of the method used to estimate it. *Mutagenesis.* 22:275-280.
- FINK, S.L. & B.T. COOKSON.** 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic

- cells. *Infect. Immun.* 73:1907-1916.
- GOZUACIK, D. & A. KIMCHI.** 2004. Autophagy as a cell death and tumour suppressor mechanism. *Oncogene.* 23:2891-2906.
- GRANVILLE, D.J.; C.M. CARTHY; D.W. HUNT & B.M. MCMANUS.** 1998. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest.* 78: 893-913.
- HARMON, R.J. & C.W. HEALD.** 1982. Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 43:992-998.
- HEALD, C. W.** 1979. Morphometric study of experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in the cow. *Am. J. Vet. Res.* 40:1294-1298.
- HOCKENBERY, D.** 1995. Defining apoptosis. *Am. J. Pathol.* 146: 16-19.
- KANZLER, S. & P.R. GALLE.** 2000. Apoptosis and the liver. *Cancer Biol.* 10: 173-184.
- KEHRLI, M.E. JR. & J.A. HARP.** 2001. Immunity in the mammary gland. *Vet. Clin. North A. Food Anim. Pract.* 17:495-516.
- KERR, J.F.R.; A.H. WYLLIE & A.R. CURRIE.** 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
- KERRO DEGO, O.; J.E. VAN DIJK & H. NEDERBRAGT.** 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet. Quart.* 24: 181-198.
- KITCHEN B.J.; G. MIDDLETON; I.G. DURWARD; R.J. ANDREWS & M.C. SALMON.** 1980. Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. *J. Dairy Sci.* 63:978- 547.
- LESCOURRET, F. & J.B. COULON.** 1994. Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:2289-2301.
- LONG, E.; A.V. CAPUCO; D.L. WOOD; T. SONSTEGARD; G. TOMITA; M.J. PA-APE & ZHAO, X.** 2001. *Escherichia coli* induces apoptosis and proliferation of mammary cells. *Cell Death Differ.* 8:808-816.
- MAJNO, G. & I. JORIS.** 1995. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146: 3-15.
- MOL, R.M.** 2000. Automated detection of oes-trus and mastitis in dairy cows. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands. Pp.177.
- NICKERSON. S. C. & C. W. HEALD.** 1981. Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *Am. J. Vet. Res.* 42:1351-1355.
- OLIVER, S. P. & L. F. CALVINHO.** 1995. Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. *J. Anim. Sci.* 73:18-33.
- OLIVER, S.P. & B.A. MICHELL.** 1983. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *J. Dairy Sci.* 66:1162-1171.
- OLIVER, S.P. & L.M. SORDILLO.** 1989. Approaches to the manipulation of mammary involution. *J. Dairy Sci.* 72:1647-1664.
- PITKALA, A.; M. HAVERI; S. PYORALA; V. MYLLYS & T. HONKANEN-BU-ZALSKI.** 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433-2441.
- RAUBERTAS, R.F. & G.E. SHOOK.** 1982. Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. *J. Dairy Sci.* 65:419-425.
- REED, J.C.** 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157:1415-1430.
- SHEFFIELD, L.G.** 1997. Mastitis increases growth factor messenger ribonucleic acid in bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* 80:2020-2024.
- SLADEK, Z. & D. RYSANEK.** 2000. Apop-

- tositis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary gland during induced influx. *Vet Res.* 31:553-563.
- SORDILLO, L. M. & S. C. NICKERSON.** 1988. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.* 49:1112-1120.
- SORDILLO, L.M. & K.L. STREICHER.** 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol.* 7:135-146.
- TRINIDAD, P.; S. C. NICKERSON & R. W. ADKINSON.** 1990. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 73:639-647.
- WALLER, K.P.** 2000. Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:231-245.
- WEINRAUCH, Y. & A. ZYCHLINSKY.** 1999. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:155-187.
- WESSON, C.A.; J. DERINGER; L.E. LIU; K.W. BAYLES; G.A. BOHACH & W.R. TRUMBLE.** 2000. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect. Immunity* 68:2998-3001.
- WESSON, C.A.; L.E. LIU; K.M. TODD; G.A. BOHACH; W.R. TRUMBLE & K.W. BAYLES.** 1998. *Staphylococcus aureus* influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 66:5238-5243.
- WILSON, D.J.; R.N. GONZALES & H.H. DAS.** 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80:2592-2598.
- ZHAO, X. & P. LACASSE.** 2007. Mammary Tissue Damage during Bovine Mastitis: Causes and Control. *J. Anim. Science.* (En prensa).