

RECEPTORES TIPO "TOLL" EN LA INMUNIDAD INNATA Y SU ROL DURANTE LA INFECCIÓN INTRAMAMARIA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

DALLARD, B. E.¹ & CALVINHO, L. F.^{1,2}

RESUMEN

El entendimiento de los mecanismos de defensa inmune de la glándula mamaria es decisivo en el desarrollo de medidas de control de la mastitis bovina. La inmunidad innata es un campo extremadamente amplio para la investigación y a pesar de los progresos logrados, el conocimiento que se tiene es todavía incompleto. Se continúa generando información acerca de los patógenos de la glándula mamaria y de las diversas defensas locales que pueden inducirse, como así también sobre la contribución de las células epiteliales mamarías en dichas defensas locales y en la movilización de leucocitos. En los últimos años se le ha dado especial importancia a la caracterización de los receptores del sistema inmune ("toll-like receptors", TLRs) y sus correspondientes ligandos en los microorganismos. Nuevas y potentes herramientas de investigación están modificando radicalmente la interpretación de la relación existente entre las defensas innatas de la glándula mamaria y las bacterias causantes de infección. En todos los casos, el objetivo principal que se persigue es aumentar la resistencia del individuo mediante la inmunomodulación y la genética, sin alterar las propiedades naturales de la leche. Las enfermedades de la glándula mamaria, principalmente las mastitis causadas como respuesta a infecciones bacterianas, son las que más perjuicio productivo y económico le ocasionan al productor y a la industria lechera. La incidencia de mastitis aumenta cuando se dañan los mecanismos de defensa de la glándula mamaria. En los últimos años, el énfasis en la selección genética para maximizar la producción ha aumentado el estrés metabólico asociado con la síntesis y secreción de leche, existiendo una correlación negativa entre la capacidad de producción y la resistencia a la mastitis. La presente revisión pretende caracterizar la respuesta inmune innata y el rol de los receptores tipo "toll" en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* a los fines de aportar mayor entendimiento en la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas de control de la enfermedad.

Palabras clave: Inmunidad innata, TLRs, mastitis, *Staphylococcus aureus*.

1.- Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL). Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: bdallard@fcv.unl.edu.ar

3.- Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA. Ruta 34, km 227. (2300) Rafaela, provincia de Santa Fe. Email: lcalvinho@rafaela.inta.gov.ar

Manuscrito recibido el 23 de noviembre de 2010 y aceptado para su publicación el 4 de febrero de 2011.

SUMMARY

Understanding the immune defenses of the mammary gland is a prerequisite for devising and developing new measures to control mastitis. Innate immunity is an extremely broad field for investigation, and despite decades of research, our present knowledge of the innate defenses of the mammary gland is incomplete. Yet, information is being gained on pathogen recognition by the mammary gland by several locally inducible defenses, as well as mammary epithelial cell contribution to local defenses and to leucocyte mobilization to the infection site. In recent years special attention has been given to characterization of immune system receptors (toll-like receptors, TLRs) and their corresponding ligands in microorganisms. Powerful new research tools are radically modifying the prospects for understanding the interplay between the mammary gland innate defenses and mastitis-causing bacteria. In all cases, the main objective is to improve the cow's resistance by modulating immune defenses and increasing genetic resistance, without altering the natural properties of milk. The mammary gland inflammation caused in response to bacterial infections causes important economic losses both to producers and dairy industry. The incidence of mastitis increases when mammary gland defense mechanisms are damaged. In recent years, emphasis on genetic selection for milk production increased the metabolic stress associated with synthesis and secretion of milk, leading to a negative correlation between production capability and mastitis resistance. This review aims to characterize the innate immune response and the role of toll-like receptors in mammary infections caused by *Staphylococcus aureus* to provide a better understanding for research and development of new alternatives to control this disease.

Key words: Innate immunity, TLRs, mastitis, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

Las mastitis subclínicas causadas por *Staphylococcus aureus* representan del 90 al 95% de todos los casos de infecciones mamarias en bovinos y usualmente son refractarias a los tratamientos con antibióticos (Zecconi *et al.*, 2006). En Argentina, se han realizado estudios sobre muestras de leche de vacas provenientes de distintos establecimientos lecheros, con el fin de determinar la prevalencia de los microorganismos causantes de mastitis en las principales cuencas lecheras. *Staphylococcus aureus* fue identificado en el 13,9-54% de los aislamientos, siendo el microorganismo predominante, tanto en casos subclínicos como clínicos de todas las cuencas analizadas (Calvinho

& Tirante, 2005).

Los programas de control de mastitis aplicados en la actualidad están basados en higiene y terapia antibiótica. Si bien existe cierta efectividad para el control de *S. aureus*, la pobre respuesta de este organismo a la terapia antibiótica ha determinado la búsqueda de nuevas alternativas de control. La infección por *S. aureus* comienza con un episodio subclínico o clínico agudo, generalmente evoluciona hacia la cronicidad y puede persistir a lo largo de toda la vida del animal (Sears & McCarthy, 2003). La eficacia de curación en casos crónicos luego del tratamiento con antibióticos es baja y no existe una terapia efectiva para eliminar por completo la infección en el cuarto mamario afectado (Waage *et al.*, 2000). Grupos de investiga-

ción en diferentes partes del mundo están focalizando sus trabajos hacia el estudio, entendimiento y el mejoramiento de los mecanismos inmunológicos de la glándula mamaria, con el objetivo de mejorar la respuesta inmunitaria y reducir el uso de drogas.

El éxito limitado de la terapia con antibióticos puede estar dado por la habilidad de *S. aureus* de evadir la respuesta inmune del hospedador y sobrevivir dentro de diferentes tipos de células de la glándula mamaria por un largo período de tiempo sin causar una inflamación aparente y/o infección clínica (Sandholm *et al.*, 1990; Almeida *et al.*, 1996; Hebert *et al.*, 2000). *Staphylococcus aureus* expresa una amplia gama de factores de virulencia secretados y asociados a la superficie bacteriana que le permiten evadir la respuesta inmune posibilitándole la sobrevivencia dentro de células fagocíticas (Foster, 2005). Con el fin de establecer una infección y sobrevivir, el patógeno hace frente a su ambiente cambiante y a continuos ataques del sistema de defensa antimicrobiano del huésped (Dryla *et al.*, 2003).

Se considera que la patogenicidad de *S. aureus* es un proceso complejo y multifactorial, resultado de la acción combinada de más de 50 factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección (colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y diseminación bacteriana). Trabajos previos han postulado que la persistencia de la infección por *S. aureus* se asocia con una respuesta inmune deficiente mediada por factores de origen bacteriano y del hospedador (Matsunaga *et al.*, 1993; Barkema *et al.*, 2006). El sistema de defensa de la glándula mamaria contra los patógenos causantes de mastitis está mediado por factores inmunológicos innatos y adquiridos, que actúan en forma coordinada, siendo la

eficiencia de estos mecanismos la que determina la resistencia a nuevas infecciones (Sordillo & Streicher, 2002; Oviedo-Boयो *et al.*, 2007).

La presente revisión pretende caracterizar la respuesta inmune innata y el rol de los receptores tipo "toll" en las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* a los fines de aportar mayor entendimiento en la patogénesis de las infecciones persistentes causadas por esta bacteria y en la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas de control de la enfermedad.

RESPUESTA INMUNE Y RECEPTORES TIPO "TOLL" (TLRs)

El sistema inmune se caracteriza por su capacidad de reconocer y discriminar entre agentes invasores extraños y moléculas producidas por el propio organismo (Janeway & Medzhitov, 2002). La glándula mamaria está protegida por dos mecanismos de defensa: la inmunidad innata y la adquirida. Ambos sistemas interactúan íntimamente para proporcionar protección contra microorganismos causantes de mastitis (Sordillo *et al.*, 1997; Rivas *et al.*, 2002; Burvenich *et al.*, 2003).

La respuesta inmune innata consiste en reacciones humorales y celulares que se inician a través de la acción de receptores de la inmunidad innata que reconocen específicamente a los organismos invasores y alertan al sistema inmune de su presencia (Fournier & Philpott, 2005). La naturaleza de los receptores del sistema inmune y sus correspondientes ligandos en los microorganismos han sido bien caracterizados; los mismos son llamados con frecuencia receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), respectivamente (Fournier & Philpott, 2005).

Los receptores tipo "toll" (TLRs, del inglés: "toll-like receptors") forman parte de los PRR, son responsables de la inducción de la producción de factores secretados como citoquinas, consisten en proteínas estructuralmente relacionadas y reconocen diferentes PAMP presentes en la superficie o en el interior de microorganismos (Akira *et al.*, 2006). Un total de 13 diferentes TLR se han descrito en ratones y seres humanos (Kai-sho & Akira, 2006). En bovinos, en los últimos años, se han descrito las secuencias de 10 TLRs (Werling *et al.*, 2006).

El sistema inmune innato se activa dentro de los primeros minutos luego de la invasión al hospedador y es responsable de la defensa durante la etapa temprana de la infección, mientras que la inmunidad adquirida requiere al menos 7 a 10 días para que se establezca una respuesta celular o humoral apropiada (Netea *et al.*, 2004).

El sistema inmune innato comprende componentes celulares tales como: monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos, células asesinas naturales ("natural killer", NK) y componentes humorales como: complemento, lisozima, lactoferrina y transferrina, entre otros. Este sistema es muy eficaz frente a la mayoría de los agentes infecciosos y durante mucho tiempo se ha sostenido que se comporta de manera inespecífica al patógeno invasor (Netea *et al.*, 2004).

La activación secundaria de la inmunidad adquirida y específica mediada por linfocitos T y B permitiría eliminar el patógeno. Si bien este escenario es correcto en cierta medida, el dogma de la naturaleza no específica de la respuesta inmune innata ha sido recientemente modificado por el descubrimiento de los TLRs; demostrándose que éstos son cruciales en el reconocimiento de microorganismos por el sistema inmune innato y que actúan como nexo entre la respuesta inmune innata y adquirida.

Los receptores "toll" han sido inicialmente descritos como receptores transmembrana tipo I, cumpliendo funciones importantes en la defensa contra hongos y bacterias Gram (+) en *Drosophila melanogaster* (Lemaitre *et al.*, 1996). Estructuralmente, se caracterizan por contener un dominio extracelular que contiene estructuras ricas en repeticiones de leucina (LRR), una sola α -hélice transmembrana y un dominio de señalización citoplasmática homólogo al del receptor de interleucina 1 (IL-1R), llamado TIR. Los TLRs en ausencia de ligando tienden a formar dímeros unidos de modo no covalente (Takeda & Akira, 2005).

La especificidad de los TLR para el reconocimiento de diferentes PAMP ha sido identificada. Esta incluye, al peptidoglucano (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias Gram (+), lipoproteínas bacterianas y zimosan por TLR2; ARN doble cadena por TLR3; lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram (-), moléculas de fibrinógeno y proteínas de choque térmico (HSPs, del inglés "heat shock proteins") por TLR4; flagelina por TLR5 y estructuras CpG del ADN bacterianos por TLR9 (Kopp & Medzhitov, 2003). Múltiples estudios han reportado ligandos microbianos adicionales para los diferentes TLR, los cuales escapan a los alcances de la presente revisión (Takeda *et al.*, 2003). Además, un creciente número de publicaciones mencionan el reconocimiento por parte de los TLR de ligandos endógenos como HSPs celulares y componentes de la matriz extracelular como fibronectina y ácido hialurónico, sugiriendo un rol en la modulación de los procesos autoinmunes (Akira & Hemmi, 2003).

La unión del ligando al receptor tipo "toll" estimula la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) y MAP quinasa conduciendo a la producción de importantes mediadores de la inmunidad innata, tales

como IL-6, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ . Concomitantemente, la señalización por TLR induce moléculas co-estimuladoras esenciales para la inducción 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 co-estimuladoras sobre las CPA y la presentación de los componentes antigénicos microbianos activan las células T CD4⁺ requeridas para iniciar la respuesta inmune adaptativa. La pérdida de co-estimulación normalmente lleva a la tolerancia (Bachmann *et al.*, 1998; Schwartz, 2003).

Con la excepción de TLR3, la señal de transducción para la mayoría de los TLR requiere de moléculas adaptadoras como el factor mioide de diferenciación 88 (MyD88) (Alexopoulou *et al.*, 2001; Takeda & Akira, 2005; Akira *et al.*, 2006). La vía dependiente de MyD88 en la señalización de TLR4 requiere de la proteína adaptadora TIRAP (TIR-"domain containing adaptor protein") y MyD88 para iniciar una cascada descendente llevando a la traslocación nuclear del NF- κ B y producción de citoquinas proinflamatorias (Kagan & Medzhitov, 2006). Por otra parte, la vía de señalización independiente está controlada por los adaptadores TICAM 1 ("toll-like receptor adaptor molecule") o TRIF (TIR-"domain containing adaptor inducing interferon- β ") y TICAM 2 o TRAM (TRIF-"related adaptor molecule") los cuales activan la transcripción del factor IRF3 (IFN "regulatory factor 3") y la producción de IFN- β (Yamamoto *et al.*, 2003a,b). TIRAP también está involucrado en la transducción de señales de TLR2 a través de la vía dependiente de MyD88 (Horng *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002). Así mientras la señalización por TLR4 y TLR2 activan NF- κ B a través de la vía dependiente de MyD88, sólo TLR4 y no TLR2 activa IRF3.

CARACTERÍSTICAS DEL TLR2 Y SU IMPLICANCIA EN LAS INFECCIONES ESTAFILOCÓCICAS

El TLR2 interactúa y une con una amplia variedad de componentes microbianos. Estos incluyen, lipoproteínas y lipopéptidos de varios patógenos, PGN y LTA de bacterias Gram (+), lipoarabinomanano de micobacterias, glucosil fosfatidil inositol de *Trypanosoma cruzi*, modulina soluble en fenol de *Staphylococcus epidermidis*, zymosan de hongos y glucolípidos de *Treponema maltophilum* (Takeda *et al.*, 2003). Además, TLR2 reconoce LPS de otros Gram (-) como *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Helicobacter pylori* (Hirschfeld *et al.*, 2001; Werts *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003). Estos LPS difieren estructuralmente de los LPS típicos de bacterias Gram (-) reconocidos por TLR4 en el número de cadenas acil en el lípido A, el cual confiere el reconocimiento diferencial (Netea *et al.*, 2002).

El mecanismo posible por el cual TLR2 reconoce un amplio espectro de componentes microbianos es que forma dímeros heterofílicos con otros TLRs como TLR1 y TLR6, los cuales están estructuralmente relacionados con TLR2. Usando lipopéptidos (LP) como estímulo, originalmente se pensó que LP diacetilados y LP triacetilados eran reconocidos por los heterodímeros TLR2/TLR6 y TLR2/TLR1, respectivamente (Takeda *et al.*, 2003). Sin embargo, ha sido observado recientemente que ciertos LP poseen capacidad de dar señal en células de ratones deficientes en los genes para TLR6 y TLR1 (Omueti *et al.*, 2005; Buwitt-Beckmann *et al.*, 2006), en forma independiente de TLR1 y TLR6 o por activación de ambos heterodímeros (TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6). La estimulación de células con diferentes LP, señalizados a través de TLR2/TLR1 o TLR2/TLR6 o ambos, siempre conduce a la misma

señal de transducción lo que sugiere que la heterodimerización podría ser un mecanismo evolutivo para ampliar el espectro de ligandos a TLR2 (Farhat *et al.*, 2008).

La participación de TLR2 ha sido implicada en la respuesta inmune del hospedador en varios modelos de infección estafilocócica, jugando un importante rol como receptor de la inmunidad innata. En la mayoría de los reportes, la supresión del gen que codifica para TLR2 incrementa la susceptibilidad del hospedador a las infecciones estafilocócicas. Ensayos en ratones deficientes en TLR2 han mostrado un aumento en la susceptibilidad a las infecciones por *S. aureus* cuando fueron desafiados con este organismo en forma endovenosa (Takeuchi *et al.*, 2000; Hoebe *et al.*, 2005). Luego de la inyección subcutánea, *S. aureus* puede multiplicarse en forma intradérmica en ratones TLR2 deficientes, no así en ratones sin deficiencias, en los cuales las bacterias son eliminadas (Hoebe *et al.*, 2005). Sin embargo, dependiendo del modelo de infección, la deficiencia de TLR2 puede ser protectora o perjudicial para el hospedador. Se ha demostrado que en tejidos de diferentes hospedadores, las células involucradas en la respuesta inflamatoria como monocitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, astrocitos y mastocitos expresan TLR2 (Visintin *et al.*, 2001; McCurdy *et al.*, 2003; Sabroe *et al.*, 2003; Esen *et al.*, 2004; Dallard *et al.*, 2009a). Es interesante observar que, TLR2 y TLR6 se expresan débilmente en células epiteliales intestinales humanas, las cuales responden pobremente a ligandos dependientes de TLR2 como LTA y modulinas de *S. aureus* solubles en fenol (Melmed *et al.*, 2003).

Petzl *et al.* (2008) demostraron por inmunohistoquímica que las células epiteliales mamarias constituyen el principal tipo celular de la glándula mamaria que expresa TLRs y β -defensina. En cuanto a TLR2, se

demostró que este receptor se localiza en la membrana apical de las células epiteliales mamarias. Esto concuerda con los hallazgos de Dallard *et al.* (2009) donde la inmunomarcación para TLR2 y TLR4 en glándulas mamarias crónicamente infectadas con *S. aureus* y en glándulas mamarias sanas se vio asociada a las células epiteliales mamarias con una fuerte expresión en el citoplasma apical.

La mayoría de los conocimientos actuales citados precedentemente sobre la implicancia de los TLRs en las infecciones por bacterias Gram (+) se basan en estudios realizados *in vitro* en células epiteliales mamarias humanas o de ratón y en estudios *in vivo* en ratones por el fácil acceso a la tecnología "knockout". En bovinos, la mayoría de los estudios se realizan *in vitro* utilizando líneas de células epiteliales mamarias y son escasos los trabajos *in vivo*.

RESPUESTA INMUNE INNATA A LA INFECCIÓN INTRAMAMARIA POR *S. AUREUS*

La infección de la glándula mamaria por *S. aureus* se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos, activación de linfocitos y producción de citoquinas. El cambio de las subpoblaciones de estas células inflamatorias durante las fases agudas y crónicas de las mastitis causadas por *S. aureus* no se ha esclarecido completamente. Estudios previos han evidenciado que durante la fase crónica de la mastitis causada por *S. aureus*, se produce un incremento en el recuento de células somáticas (neutrófilos) de 3-22% (glándula mamaria no infectada) a 55-96% (glándula mamaria infectada) (Riollet *et al.*, 2001). El reclutamiento de neutrófilos a la glándula mamaria infectada es promovido por IL-8, sin embargo en infecciones

subclínicas, esta interleuquina no ha sido detectada en leche y el factor C5a mostró solo un incremento transitorio a las 32 h post inoculación (Riollet *et al.*, 2000; Bannerman *et al.*, 2004). Estos hallazgos sugieren que el reclutamiento de neutrófilos a la glándula mamaria no depende solamente de la actividad quimiotáctica de estas moléculas.

La actividad de las células inmunes durante los estadios tempranos de la patogenia tiene un rol central en el establecimiento de la infección intramamaria (IIM), cumpliendo un papel principal los macrófagos como primera señal de alarma frente a la exposición a productos bacterianos (Rainard & Riollet, 2006). Estudios previos realizados durante el periodo de involución activa de la glándula mamaria bovina, 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. El mayor número de monocitos/macrófagos en cuartos mamarios infectados se observó al día 7 comparado con el día 14 y 21 del secado (Dallard *et al.*, 2009b). Estos resultados sugieren un rol central de estas células en las mastitis crónicas por *S. aureus* durante el proceso de remodelación mamaria.

TNF- α e IL- 1β son las citoquinas pro-inflamatorias más importantes producidas en reacciones inflamatorias como por ejemplo, en IIM causadas por *S. aureus*. Transcriptos de ARNm para estas citoquinas han sido encontrados en leche de vacas con mastitis, sin embargo los péptidos correspondientes no han sido detectados (Riollet *et al.*, 2000, 2001). Incrementos significativos en la transcripción de TNF- β fueron detectados en mastitis clínicas causadas por *S. aureus* a las 24 h pi, con una marcada disminución 36 h pi (Alluwaimi *et al.*, 2003). Esta disminución coincidió con un incremento en la pro-

ducción de IL- 1β que se mantuvo elevada por 8 horas. Estos resultados sugieren que ambas citoquinas tienen funciones pro-inflamatorias importantes en los primeros estadios de la infección que podrían explicar la ineficiencia de la respuesta inmune de la glándula mamaria al favorecer el establecimiento de la infección y la evolución de ésta hacia la cronicidad. Por otra parte, Bannerman *et al.* (2004) comprobaron que *S. aureus* induce una respuesta disminuida de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 y TNF- α en el hospedador. Asimismo, Rainard *et al.* (2008) detectaron la presencia de IL-8 en leche en respuesta a la infección experimental por *S. aureus*, aunque la concentración alcanzada fue inferior a la obtenida tras la inoculación de LTA de *S. aureus* purificado. Es necesario aún esclarecer si la respuesta inmune diferencial observada por distintos autores contribuye a la cronicidad de infección bacteriana.

En un estudio reciente, realizado durante el periodo de involución activa de la glándula mamaria bovina, se encontró que en cuartos mamarios infectados crónicamente por *S. aureus*, expresión de TNF- α fue significativamente mayor a la hallada en cuartos no infectados durante las tres primeras semanas posteriores al secado (Dallard *et al.*, 2009b). Estos datos sugieren que TNF- α podría jugar un papel importante en el establecimiento y en la evolución a la cronicidad de la IIM por *S. aureus* durante el proceso de remodelación.

ROL DE LOS TLR EN LAS INFECCIONES INTRAMAMARIAS POR *S. AUREUS*

En un modelo de mastitis experimental por *S. aureus* en glándula mamaria bovina, Goldammer *et al.* (2004) observaron regula-

ción positiva coordinada en la expresión de ARNm para TLR4 y TLR2. Adicionalmente, la expresión coordinada para los mismos TLR fue observada en inflamaciones inducidas en células epiteliales renales (Wolfs *et al.*, 2002) y en células HeLa infectadas con *Trichomonas vaginalis* (Chang *et al.*, 2006). Sin embargo, estos hallazgos no pudieron relacionarse con información adicional que esclarezca si el aumento de TLR2 y TLR4 se traducía en una mejora en el reconocimiento del patógeno. Actualmente, existe escasa información disponible acerca de los roles de los adaptadores de señalización de TLR4 y TLR2 en la traslocación de los factores de transcripción NF- κ B y IRF3, los cuales son los iniciadores fundamentales para la expresión de las citoquinas proinflamatorias requeridas por las células epiteliales mamarias bovinas en respuesta a los patógenos invasores.

Como fuera mencionado, *S. aureus* causa frecuentemente infecciones subclínicas y crónicas de la glándula mamaria. Yang *et al.* (2008) examinaron si una inadecuada activación de los receptores de patógenos TLR2 y TLR4 por ligandos derivados de *S. aureus* podría contribuir a los mecanismos moleculares que sustentan las estrategias de escape de las defensas inmunes mamarias del hospedador por parte del patógeno. Estos investigadores observaron que infecciones con *E. coli* y *S. aureus* inducían la expresión de genes para IL-8 y TNF- α en cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas (pbMEC), aunque *S. aureus* en un grado 5% menor al de *E. coli*. Esta respuesta disminuida en la expresión de citoquinas para *S. aureus* estuvo acompañada por una pérdida completa de la activación de NF- κ B por *S. aureus* o LTA en pbMEC. En base a estos resultados, estos autores concluyeron que la causa de la inadecuada respuesta inmune inducida por *S. aureus* no se debió a una

alteración en la unión del TLR a su ligando, sino a una regulación negativa de la activación de NF- κ B en pbMEC por el patógeno, debilitando gravemente la respuesta inmune en la glándula mamaria.

Para estudiar la interacción de *S. aureus* y diferentes tipos celulares se han realizado múltiples ensayos *in vitro*. En estos sistemas *S. aureus* puede ser internalizado por células epiteliales de la glándula mamaria bovina (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Anaya-López *et al.*, 2006) y células endoteliales de aorta bovina (Hamill *et al.*, 1986; Vann & Proctor, 1987). Recientemente, Stranberg *et al.* (2005), han demostrado que las células epiteliales mamarias bovinas estimuladas por 24 h con LPS pero no con LTA producen IL-1 β , IL-8, TNF- α y β -defensinas. Por otra parte, cuando la estimulación con LPS o LTA se realizó por 2 a 4 h, se observó un rápido incremento en la expresión de ARNm para las diferentes citoquinas evaluadas pero que sólo logró ser sostenida en el tiempo para LPS. En células estimuladas con LTA, la expresión de genes para las diferentes citoquinas mencionadas retornó a los niveles basales 8 a 16 h posteriores al estímulo. En un estudio reciente, se detectó IL-1 β en leche de vacas a las 4 y 8 h pi intramamaria de 100 y 10 μ g, respectivamente, de LTA de *S. aureus* purificado; retornando a niveles pre inoculación entre 24 y 72 h pi (Rainard *et al.*, 2008). Asimismo, estos autores detectaron TNF- α tras la inoculación intramamarias de 100 μ g de LTA de *S. aureus* solamente entre 4 y 8 h pi. La limitada y poco sostenida respuesta en la expresión de citoquinas en respuesta a LTA podría explicar por qué las mastitis causadas por *S. aureus* muestran mayor potencial para evadir la respuesta inmune innata y favorecer el establecimiento de la IIM, lo cual podría facilitar la posterior evolución hacia la cronicidad comparado con las infecciones

por bacterias Gram (-), así como por otros organismos Gram (+). Cabe mencionar que se ha demostrado que el *Streptococcus uberis* induce la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-8 luego del incremento de células somáticas en leche de vacas infectadas experimentalmente (Rambeaud *et al.*, 2003), lo cual difiere de lo previamente descrito en IIM por *S. aureus* (Riollet *et al.*, 2000; Bannermann *et al.*, 2004).

Estudios realizados en células endoteliales de vena umbilical de seres humanos demostraron que las mismas son capaces de secretar IL-1 β , IL-6 e IL-8 luego de la infección *in vitro* con *S. aureus* (Yao *et al.*, 1995; Strindhall *et al.*, 2005). En la respuesta inmune innata, las células endoteliales no solo responden a muchas citoquinas, sino que también producen algunas de ellas. Oviedo-Boyso *et al.* (2007) reportaron que la endocitosis de *S. aureus* por células endoteliales bovinas está modulada por TNF- α e IL-1 β . Es probable que la activación de NF- κ B por estas citoquinas estimule la expresión de genes que participan en la adhesión y endocitosis de *S. aureus* por células endoteliales bovinas. Esta suposición se basa en resultados en los cuales la traslocación de NF- κ B al núcleo fue detectada en neutrófilos recuperados de leche de vacas con mastitis (Boulangier *et al.*, 2003). Dado el importante rol que juega NF- κ B en la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, es posible que la transcripción de este factor también participe en la patogenia de la mastitis causada por *S. aureus* y otras bacterias.

Watanabe *et al.* (2007) determinaron los niveles de fagocitosis y consecuente muerte de las bacterias fagocitadas por macrófagos obtenidos de ratones deficientes en TLR2 y en ratones "wild-type" para examinar el posible rol de TLR2 en la respuesta celular. Los resultados mostraron que la

fagocitosis de *S. aureus* y *E. coli* fue similar entre macrófagos provenientes de ratones deficientes en TLR2 y ratones "wild-type". Por otra parte, ambas cepas, demostraron un nivel reducido de superóxido en los macrófagos que habían fagocitado *S. aureus*. Estos investigadores proponen que tras haber reconocido a *S. aureus*, el receptor TLR2 activa la vía de las MAP quinasas para suprimir la producción de superóxido, lo que conduce a prolongar la vida de las bacterias en los fagosomas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El conocimiento de los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa en la glándula mamaria ha avanzado en forma significativa en los últimos años. Sin embargo, la mastitis bovina continúa siendo una enfermedad de alta prevalencia en los rodeos y con limitada respuesta a los tratamientos con antibióticos. La pobre respuesta a los antibióticos ha motivado la búsqueda de tratamientos alternativos y nuevas estrategias de control. La respuesta inmune de la glándula mamaria es compleja debido a que la mastitis es una enfermedad causada por una amplia variedad de agentes infecciosos, cada uno con mecanismos patogénicos diferentes. El desafío en los años venideros será la obtención de una panorámica completa de los factores que afectan la interacción entre diferentes agentes etiológicos y las células de la glándula mamaria. Asimismo, el estudio detallado de la modulación de estas interacciones por las citoquinas será una herramienta valiosa en el diseño de métodos de base biotecnológica para la prevención de esta enfermedad.

Si se tiene en cuenta que el reconocimiento de los patógenos por el sistema de TLR

induce la expresión de moléculas co-estimuladoras esenciales para la inducción de la respuesta inmune adaptativa, los conocimientos que se generen en bovinos podrían aportar mayor información acerca del uso de adyuvantes de vacunas que estén dirigidos a interactuar con el sistema de TLR y así promover una óptima inmunoes- timulación. En otras palabras, si se conoce cómo estimular al máximo el sistema de TLR, esto podría ser la clave para mejorar las formulaciones para la inmunización contra de patógenos causantes de IIM en bovinos.

BIBLIOGRAFÍA

- AKIRA, S.; S. UEMATSU & O. TAKEUCHI.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- AKIRA, S. & H. HEMMI.** 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 85:85-95.
- ALEXOPOULOU, L.; A.C. HOLT; R. MEDZHITOV & R.A. FLAVELL.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation by toll-like receptor 3. *Nature.* 413:732-738.
- ALMEIDA, R.A.; K.R. MATTHEWS; E. CIFRIAN; A.J. GUIDRY & S.P. OLIVER.** 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 79:1021-1026.
- ALLUWAIMI, A.M.; C.M. LEUTENEGGER; T.B. FARVER; P.V. ROSSITTO; W.L. SMITH & J.S. CULLOR.** 2003. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J. Vet. Med. B.* 50:105-111.
- ANAYA-LÓPEZ, J.L.; O.E. CONTRERAS-GUZMÁN; A. CÁRABEZ-TREJO; V.M. BAIZABAL-AGUIRRE; J.E. LÓPEZ-MEZA; J.J. VALDEZ-ALARCÓN & A. OCHOA-ZARZOSA.** 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 81:358-361.
- BACHMANN, M.F.; R.M. ZINKERNAGEL & A. OXENIUS.** 1998. Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *J. Immunol.* 161:5791-5794.
- BANNERMAN, D.D.; M.J. PAAPE LEE; J.W. LEE; X. ZHAO; J.C. HOPE & P. RAINARD.** 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:463-472.
- BARKEMA, H.W.; Y.H. SCHUKKEN & R.N. ZADOKS.** 2006. The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89:1877-1895.
- BAYLES, K.W.; C.A. WESSON; L.E. LIU; L.K. FOX; G.A. BOHACH & W.R. TRUMBLE.** 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66:336-3342.
- BOULANGER, D.; F. BUREAU; D. MELOTTE; J. MAINIL & P. LEKEUX.** 2003. Increased nuclear factor kB activity in milk cells of mastitis affected cows. *J. Dairy Sci.* 86:1259-1267.
- BURVENICH C.; V. VAN; J. MERRIS MEHRZAD; A. DIEZ-FRAILE & L. DUCHATEAU.** 2003. Severity of *Escherichia coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34:521-564.
- BUWITT-BECKMANN, U.; H. HEINE; K.H. WIESMÜLLER; G. JUNG; R. BROCK; S. AKIRA & A.J. ULMER.** 2006. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J. Biol. Chem.* 281: 9049-9057.
- CALVINHO, L.F. & L. TIRANTE.** 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 Cs. Vet.* 4:29-40.
- CHANG, J. H.; J.Y. PARK & S.K. KIM.** 2006. Dependence on p38 MAPK signaling in the up-regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis* treated HeLa cells. *Immunology.* 118:164-170.
- DALLARD, B.; C. BARAVALLE; M. CADOCHE; S. PUJATO; M. TUMINI & L. CALVINHO.** 2009a. Inmunomarcación de receptores tipo toll en glándula mamaria bovina crónicamente infectada con *Staphylococcus aureus* durante la involución temprana. II Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria, Rosario, Santa Fe. Resumen. Pg. 23.
- DALLARD, B.E.; C. BARAVALLE; H. ORTEGA; M. TUMINI; V. R. CANAVESIO; V. E. NEDER & L.F. CALVINHO.** 2009b. Effect of a biological response modifier on expression of CD14 receptor and tumor necrosis factor-alpha in *Staphylococcus aureus* infected mammary glands at drying off. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132:237-242.
- DRYLA, A.; D. GELBMANN; V.A. GABAIN & E. NAGY.** 2003. Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-hemoglobin binding activity. *Mol. Microbiol.* 49: 37-53.
- ESEN, N.; F.Y. TANGA; J.A. DELEO & T. KIELIAN.** 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *J. Neurochem.* 88:746-758.
- FARHAT, K.; K.S. SAUTER; M. BRCIC; J. FREY; A.J. ULMER & T.W. JUNGL.** 2008. The response of HEK293 cells transfected with bovine TLR2 to established pathogen-associated molecular patterns and to bacteria causing mastitis in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15:326-336.
- FOSTER, T. J.** 2005. Immune evasion by *Staphylococci*. *Nature.* 3:948-958.
- FOURNIER, B. & D.J. PHILPOTT.** 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol. Rev.* 18:521-540.
- GOLDAMMER, T.; H. ZERBE; A. MOLENAAR; H.J. SCHUBERTH; R.M. BRUNNER; S.R. KATA & H.M. SEYFERT.** 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of β -defensin 5, toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:174-185.
- HAMILL, R.J.; J.M. VANN & R.A. PROCTOR.** 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* 54:833-836.
- HEBERT, A.; K. SAYASITH; S. SENECHAL; P. DUBREUIL & J. LAGACE.** 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.* 193:57-62.
- HIRSCHFELD, M.; J. J. WEIS; V. TOSHCHAKOV; C. A. SALKOWSKI; M.J. CODY; D.C. WARD; N. QURESHI; S.M. MICHALEK & S.N. VOGEL.** 2001. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* 69:1477-1482.
- HOEBE, K.; P. GEORGEL; S. RUTSCHMANN; X. DU; S. MUDD; K. CROZAT; S. SOVATH; L. SHAMEL; T. HARTUNG; U. ZAHNINGER & B. BEUTLER.** 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature.* 433:523-527.
- HORNG, T.; G.M. BARTON & R. MEDZHI-TOV.** 2001. TIRAP: an adapter molecule in the toll signaling pathway. *Nat. Immunol.*

- 2:835-841.
- JANEWAY Jr, C. A. & R. MEDZHITOV.** 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.
- KAGAN, J.C. & R. MEDZHITOV.** 2006. Phosphoinositide mediated adaptor recruitment controls toll-like receptor signaling. *Cell.* 125: 943-955.
- KAISHO, T. & S. AKIRA.** 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:979-987.
- KOPP, E. & R. MEDZHITOV.** 2003. Recognition of microbial infection by toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 15:396-401.
- LEMAITRE, B.; E. NICOLAS; L. MICHAUT; J.M. REICHHART & J.A. HOFFMANN.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86:973-983.
- MATSUNAGA, T.; S. KAMATA; N. KAKIICHI & K. UCHIDA.** 1993. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 55:297-300.
- MCCURDY, J.D.; T.J. OLYNYCH; L.H. MAHER & J.S. MARSHALL.** 2003. Cutting edge: distinct toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J. Immunol.* 170:1625-1629.
- MELMED, G.; L.S. THOMAS; N. LEE; S.Y. TEFAY; K. LUKASEK; K.S. MICHELSSEN; Y. ZHOU; B. HU; M. ARDITI & M.T. ABREU.** 2003. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J. Immunol.* 170:1406-1415.
- NETEA, M.G.; W.M. VAN DER MEER & B. KULLBERG.** 2004. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *TRENDS Microbiol.* 12:484-488.
- NETEA, M.G.; M. VAN DEUREN; B. J. KULLBERG; J. M. CAVALLON & W.M. VAN DER MAER.** 2002. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* 23:135-139.
- OMUETI, K.O.; J. M. BEYER; C. M. JOHNSON; E.A. LYLE & R.I. TAPPING.** 2005. Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J. Biol. Chem.* 280:36616-36625.
- OVIEDO-BOYSO, J.; J. J. VALDEZ-ALARCON; M.CAJERO-JUAREZ; A. OCHOAZARZOSA; J.E. LOPEZ-MEZA; A. BRAVO-PATINO & V. M. BAIZABAL-AGUIRRE.** 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 54:399-409.
- PETZL, W.; H. ZERBE, J. GÜNTHER; W. YANG; H. M. SEYFERT; NÜRNBERG, G. & H. J. SCHUBERTH.** 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.* 39:18-23.
- RAINARD, P. & C. RIOLLET.** 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37:369-400.
- RAINARD, P.; A. FROMAGEAU.; P. CUNHA & F. GILBERT.** 2008. *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Vet. Res.* 39:52-
- RAMBEAUD, M.; R. A. ALMEIDA; G. M. PIGHETTI & S. P. OLIVER.** 2003. Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15:193-205.
- RIOLLET, C.; P. RAINAR & B. POUTREL.** 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with

- Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7:161-167.
- RIOLLET, C.; P. RAINARD & B. POUTREL.** 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. J. Dairy Sci. 84:1077-1084.
- RIVAS, A.L.; R. TADEVOSYAN; F.W. QUIMBY; T. COKSAYGAN & D.H. LEIN.** 2002. Identification of subpopulation of bovine mammary-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. Can. J. Vet. Res. 66:165-172.
- SABROE, I.; L. R. PRINCE; E.C. JONES; M.J. HORSBURGH; S.J. FOSTER; S.N. VOGEL; S.K. DOWER & M.K. WHYTE.** 2003. Selective roles for Toll-like receptor TLR2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. J. Immunol. 170:5268-5275.
- SANDHOLM, M.; L. KAARTINEN & S. PÿORALA.** 1990. Bovine mastitis-why does antibiotic therapy not always work? An overview. Vet. Pharmacol. Ther. 13:248-260.
- SEARS, P.M. & K.K. MCCARTHY.** 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 19:171-185.
- SCHWARTZ, R. H.** 2003. T cell anergy. Annu. Rev. Immunol. 21:305-334.
- SMITH Jr M.F.; A. MITCHELL; G. LI; S. DING; A. M. FITZMAURICE; K. RYAN; S. CROWE & J.B. GOLDBERG.** 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. J. Biol. Chem. 278:32552-32560.
- SORDILLO, L. M.; K. SHAFER-WEAVER & D. DEROSA.** 1997. Immunobiology of the mammary gland. J. Dairy Sci. 80:1851-1865.
- SORDILLO, L.M. & K.L. STREICHER.** 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J. Mammary Gland. Biol. 7:135-146.
- STRANDBERG, Y.; C. GRAY; T. VUOCOLO; L. DONALDSON; M. BROADWAY & R. TELLAM.** 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in ovine mammary epithelial cells. Cytokine. 31:72-86.
- STRINDHALL J.; P. E. LINGREN; S. LÖFGREN & E. KIHLSSTRÖM.** 2005. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* vary in ability to stimulate cytokine expression in human. Scand. J. Immunol. 67:57-62.
- TAKEDA, K. & S. AKIRA.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. Int. Immunol. 17:1-14.
- TAKEDA, K.; T. KAISHO & S. AKIRA.** 2003. Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol. 21:335-376.
- TAKEUCHI, O.; K. HOSHINO & S. AKIRA.** 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. J. Immunol. 165:5392-5396.
- VANN, J. M. & R. A. PROCTOR.** 1987. Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time and inoculum-dependent damage to endothelial cell monolayers. Infect. Immun. 55:2155-2163.
- VISINTIN, A.; A. MAZZONI; J.H. SPITZER; D.H. WYLLIE; S.K. DOWER & D.M. SEGAL.** 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. J. Immunol. 166:249-255.
- WAAGE, S.; H. R. SKEI & J. RISE.** 2000. Outcome of clinical mastitis in dairy heifers assessed by reexamination of cases one month after treatment. J. Dairy Sci. 83:70-76.
- WATANABE, I.; M. ICHIKI; A. SHIRATSUCHI & Y. NAKANISHI.** 2007. TLR2-mediated survival of *S. aureus* in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity. J. Immunol.

- 178:4917-4925.
- WERLING, D.; J. PIERCY & T. J. COFFEY.** 2006. Expression of toll-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112:2-11.
- WERTS, C.; R.I. TAPPING; J.C. MATHISON; T. H. CHUANG; V. KRAVCHENKO; I. SAINT GIRONS; D. A. HAAKE; P. J. GODOWSKI; F. HAYASHI; A. OZINSKY; D.M. UNDERHILL; C.J. KIRSCHNING; H. WAGNER; A. ADEREM; P.S. TOBIAS & R.J. ULEVITCH.** 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2:346-352.
- WOLFS, T. G.; W. A. BUURMAN; A. VAN SCHADEWIJK; B. DE VRIES; M. A. DAEMEN; P. S. HIEMSTRA & C. VAN 'T VEER.** 2002. In vivo expression of toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J. Immunol.* 168:1286-1293.
- YAMAMOTO, M.; S. SATO; H. HEMMI; H. SANJO; S. UEMATSU; T. KAISHO; K. HOSHINO; O. TAKEUCHI; M. KOBAYASHI; T. FUJITA; K. TAKEDA & S. AKIRA** 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 420:324-329.
- YAMAMOTO, M.; S. SATO; H. HEMMI; K. HOSHINO; T. KAISHO; H. SANJO; O. TAKEUCHI; M. SUGIYAMA; M. OKABE; K. TAKEDA & S. AKIRA** 2003a. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 301:640-643.
- YAMAMOTO, M.; S. SATO; H. HEMMI; S. UEMATSU; K. HOSHINO; T. KAISHO; O. TAKEUCHI; K. TAKEDA & S. AKIRA.** 2003b. TRAM is specifically involved in the toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent pathway. *Nat. Immunol.* 4:1144-1150.
- YANG, W.; H. ZERBE; W. PETZL; R.M. BRUNNER; J. GÜNTHER; C. DRAING; S. VONAULOCK; H.J. SCHUBERTH & H.M. SEYFERT.** 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol. Immunol.* 45:1385-1397.
- YAO, L.; V. BENGUADIL; F. D. LOWY; J. J. GIBBONS; V. B. HATCHER & J. W. BERMAN.** 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect. Immun.* 63:1835-1839.
- ZECCONI, A.; L. F. CALVINHO, & K. L. FOX.** 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *IDF Bulletin* 408, 42.