

## ***5. DISCUSIÓN***

---

### 5.1. Ensayo dosis – respuesta

Los ensayos microbiológicos y el RCS en leche son los métodos más sensibles para medir si el animal presenta infección e inflamación mamaria, respectivamente. El RCS representa una herramienta analítica rápida y segura, y sus resultados permiten hacer inferencia al estado inmunológico en que se encuentre el animal (O'Brien y col., 1999; Leitner, y col., 2000). En este trabajo, la dosis del EPg utilizada (3 mg/ml) se mostró segura para los animales, causando solamente una inflamación leve en los cuartos mamarios inoculados. Esta dosis seleccionada, no sólo produjo un pico elevado en el RCS, sino que también se mantuvo a lo largo del periodo de muestreo. Cabe destacar, que en todos los grupos ensayados con las distintas dosis de EPg, el patrón de aumento en el RCS fue similar, siendo la dosis elegida, la de mayor recuento a las 24 hs PI. Este elevado RCS puede ser debido al reclutamiento acelerado de LPMN en la glándula mamaria luego de la inoculación con el EPg. El flujo masivo de células en este tiempo de evaluación, seguido de una declinación a lo largo del periodo de muestreo, simularía las mismas variaciones encontradas en el RCS frente a una infección bacteriana experimental por *E. coli* (Lee y col., 2006), en donde luego de la inoculación intramamaria de una solución conteniendo dicha cepa (40 unidades formadoras de colonias-UFC), en cuartos mamarios sanos, generó un aflujo de células somáticas (principalmente neutrófilos) a las 24 hs PI, y con un descenso leve en el RCS a partir de este periodo y hasta las 72 hs PI. Estos resultados, además, concuerdan con los obtenidos en estudios realizados por Dallard y col. (2009), en donde se inoculó en forma intramamaria un LPS bacteriano (proveniente de la cepa LN02 de *E. coli*), al momento del secado. Este producto causó un pronunciado incremento en el RCS a las 48 hs PI en cuartos mamarios libres de infección, seguido por una disminución lenta a lo largo del periodo de muestreo.

El ácido lipoteicoico (LTA) es considerado uno de los PAMPs localizado en la pared celular bacteriana de *S. aureus*. El LTA ha demostrado ser un potente estimulador de la síntesis y secreción de citoquinas y del reclutamiento de neutrófilos a la glándula mamaria (Poutrel y col., 1983; Morath y col., 2001).

En estudios realizados por Rainard y col. (2008), se encontró que luego de infusiones intramamarias con soluciones de LTA (dosis de 10 µg/0,5 ml de medio de cultivo RPMI y 100 µg/0,5 ml RPMI) en cuartos mamarios libres de IIM, se produjo un

aumento pronunciado en el RCS a las 16 hs PI de LTA (dosis 10 µg) y a las 12 horas PI de LTA (dosis de 100 µg), y posteriormente un marcado descenso a partir de las 24 hs PI para ambas dosis utilizadas. Estos resultados, sugieren un patrón similar al obtenido en el presente trabajo en el perfil del RCS. La variación de los resultados obtenidos en las horas analizadas puede ser debida a las propiedades del compuesto utilizado como MRB.

## **5.2. Efecto del EPg sobre la proliferación celular en el periodo de involución**

Una adecuada regresión, proliferación y diferenciación del epitelio mamario secretor durante el periodo no lactante en rumiantes, es esencial para una máxima producción de leche en la lactancia siguiente (Oliver y Sordillo, 1989). La etapa temprana de la involución se caracteriza por el colapso de los alvéolos, incluyendo la muerte de las células alveolares secretoras (apoptosis celular) y la remoción de los residuos de leche (Monks y col., 2002).

Para corroborar que el tratamiento con el EPg no influenciara la regresión normal del tejido mamario se determinó la proliferación celular con PCNA. En todos los cuartos mamarios, tanto los tratados con el EPg como con placebo y cuartos controles, no se obtuvieron diferencias en los porcentajes de marcación, lo que indicó claramente que el tratamiento con EPg no causó modificaciones a nivel del índice de proliferación celular. Además, no se encontraron diferencias en las dos porciones del tejido mamario evaluadas (estroma y parénquima) para todos los grupos estudiados.

Cabe destacar que, como complemento a este trabajo, las muestras de tejido mamario fueron inmunomarcadas con Ki-67, una proteína nuclear que se expresa durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular y se relaciona directamente con la actividad proliferativa en diferentes tejidos. En las muestras analizadas, se observó que no hubo diferencias en el porcentaje de proliferación celular tanto para los cuartos tratados con el EPg como para los controles, así como tampoco se encontraron diferencias entre las dos porciones de la glándula mamaria evaluadas (Dallard y col., 2011).

### 5.3. Efecto del EPg sobre la inmunidad innata en el periodo de involución

La moderada efectividad de los tratamientos antibióticos para eliminar ó prevenir IIM por patógenos, señala la necesidad de generar terapias alternativas (Zhen y col., 2009). Los mecanismos de defensa del sistema inmune pueden ser mejorados de dos maneras: por vacunación ó por el uso de MRB. Este último enfoque, implica el uso de sustancias biológicas ó químicas que pueden modificar la respuesta no específica del hospedador frente a patógenos (Castrucci y col., 1996).

La producción y liberación de citoquinas, es central para la regulación del sistema inmune innato y adaptativo. Células presentes en el sitio de infección, como macrófagos, células NK, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales, son capaces de producir citoquinas en respuesta a la infección. Estas citoquinas son conocidas como “citoquinas tempranas” y dentro de esta clasificación se incluyen a la IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , factor estimulante de colonias (G-CSF), e IL-8 (Kelso, 1989; Oppenheim y col., 1991).

#### 5.3.1. Expresión de TNF- $\alpha$

EL TNF- $\alpha$  es una de las “citoquinas tempranas” secretadas por células inmuno-competentes frente a un estímulo microbiano (Chou y col., 2009). Esta citoquina ha sido detectada y monitoreada tanto en glándula mamaria bovina sana como infectada (Alluwaimi, 2004). Numerosos estudios han encontrado niveles elevados de TNF- $\alpha$  durante toda la lactancia, involución y en el parto, excepto en un periodo corto antes del parto, cuando este disminuye a niveles indetectables. Elevados niveles de TNF- $\alpha$  podrían estar relacionados con el mantenimiento y regulación de las funciones inmunológicas de las células y factores involucrados en los cambios fisiológicos de la glándula mamaria (Rewinski y Yan 1994; Sordillo y col., 1991; 1997).

Para estudiar este factor importante de la inmunidad innata en glándula mamaria y sus secreciones, en el presente trabajo, se aplicaron técnicas de inmunohistoquímica y de biología molecular que permitieron evaluar la síntesis, expresión y secreción de TNF- $\alpha$ .

La localización específica de la proteína en tejido mamario mediante inmunohistoquímica se vio asociada al parénquima y estroma mamario. El citoplasma

de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos intraepiteliales reaccionó intensamente a la inmunomarcación con TNF- $\alpha$  al igual que los endotelios y fibras musculares lisas de los vasos sanguíneos. Se observó marcación intensa del citoplasma de las células epiteliales alveolares y de conductos excretores de la glándula mamaria. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por otros autores en glándulas mamarias bovinas inoculadas con MRB conteniendo LPS bacteriano, tanto libres de infección como infectadas (Dallard y col., 2009). Además, Basolo y col. (1993), observaron la expresión de TNF- $\alpha$  en células epiteliales mamarias humanas *in vitro*; mientras, Miles y col. (1994), localizaron a esta citoquina y a su receptor (RTNF- $\alpha$ ) en el estroma mamario humano. Estos y otros hallazgos obtenidos en diferentes animales (Ip y col., 1992), muestran que esta citoquina no solo se expresa en la glándula mamaria bovina, sino también en glándula mamaria de otras especies.

El TNF- $\alpha$  fue primeramente identificado como regulador potencial de la proliferación y diferenciación celular (Ip y col., 1992). El efecto de esta proteína sobre la proliferación celular en células mamarias de ratas fue evaluada *in vitro*, bajo condiciones de cultivo óptimas. Como resultado principal de ese estudio, se determinó que cuando las células fueron estimuladas con TNF- $\alpha$  en una concentración de 10 U/ml, se obtenían diferencias significativas en el índice de proliferación celular a los 14 y 21 días de cultivo (Ip y col., 1992). Cabe remarcar, que en el presente estudio, si bien se encontraron diferencias significativas en la expresión de TNF- $\alpha$  en los cuartos tratados con el EPg, comparados con los cuartos con placebo y controles, no se detectaron diferencias en el índice de proliferación celular entre los grupos experimentales evaluados. Se puede inferir que al día 7 de la involución, los niveles de TNF- $\alpha$  no fueron lo suficientemente elevados como para generar una diferencia significativa en el índice de proliferación celular. Además, no es posible establecer comparaciones más profundas entre ambos estudios, debido no solamente a las diferencias entre especies sino también a las condiciones *in vitro* e *in vivo* empleadas en cada caso.

En el presente estudio, la inoculación intramamaria de una dosis de 3 mg/ml de un extracto de *P. ginseng*, en cuartos mamarios libres de IIM, produjo un aumento significativo en la inmunomarcación para TNF- $\alpha$  al día 7 de involución comparado a cuartos inoculados con placebo y controles, indicando la persistencia en su síntesis. Por otra parte, este aumento en la marcación de TNF- $\alpha$  en cuartos mamarios tratados con EPg, coincide con un número significativamente mayor de monocitos-macrófagos,

determinado por la expresión de CD14, al día 7 del secado. Estos resultados, considerados en conjunto, muestran que el compuesto utilizado en este estudio como posible MRB posee la capacidad de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias y provocar el aflujo de monocitos-macrófagos en cuartos mamarios libres de IIM sin causar efectos adversos en el animal.

La prontitud con que el TNF- $\alpha$  se libera es debido a la acumulación de su precursor, una proteína de 26 kDa (pro-TNF- $\alpha$ ), que se encuentra en la membrana plasmática de las células inmunocompetentes, y su clivaje, por medio de una enzima de membrana (TACE) obteniéndose como producto final una proteína soluble de 17 kDa (Solomon y col., 1999; Murray y col., 2005). La liberación de la proteína final de 17 kDa es rápida y temprana en respuesta a cambios en el medio ambiente ó a estímulos endógenos. En el presente trabajo, la inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa obtenidas por western blot en secreciones mamarias durante el muestreo fue coincidente con un estudio previo (Chou y col., 2009). Estos autores evaluaron mediante western blot los niveles relativos de TNF- $\alpha$  encontrados en secreciones mamarias de bovinos en lactancia, al último día del ordeño (semana 0) y las semanas 1, 2 y 3 del secado. Los resultados indicaron que el anticuerpo utilizado detectaba dos bandas en las zonas correspondientes a los 26 kDa (pro-TNF- $\alpha$ ) y a los 17 kDa solamente en secreciones mamarias en el periodo de secado. Estos resultados coinciden con lo hallado en el presente trabajo para los cuartos inoculados con el EPg, ya que al día 0 de la toma de muestra, no se detectó la proteína, mientras que a las 24 hs y 48 hs PI, se hallaron las dos bandas (26 y 17 kDa). Si bien solamente se realizó la cuantificación de la expresión de la proteína TNF- $\alpha$  de secreción (17 kDa) en leche, cabe destacar que se detectaron bandas correspondientes a dicho peso molecular únicamente en aquellos cuartos mamarios inoculados con el EPg, no así en cuartos inoculados con placebo, con un aumento significativo en los niveles de expresión a las 24 y 48 hs PI y una tendencia a la disminución hasta las 72 hs PI para los cuartos tratados con el EPg.

En cuanto a la cuantificación del TNF- $\alpha$  por western blot en muestras de tejido mamario, las dos formas de la proteína, pro-TNF- $\alpha$  de 26 kDa y la proteína final de secreción (17 kDa) se encontraron presentes tanto en los cuartos tratados con el EPg como en cuartos inoculados con placebo y controles. Sin embargo, la inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa arrojó diferencias significativas en la proteína de 26

kDa para los cuartos inoculados con el EPg comparado a los cuartos con placebo y controles, no así para la proteína de secreción de 17 kDa. Por lo tanto se podría afirmar que estos resultados son coincidentes a los hallados por IHQ, donde se encontró mayor expresión de TNF- $\alpha$  en cuartos inoculados con el EPg los 7 días de involución, y que esta marcación estuvo ligada en mayor medida a la proteína anclada a la membrana de 26 kDa (pro-TNF- $\alpha$ ) y en menor medida a la proteína de secreción (17 kDa). Aunque la expresión y síntesis de TNF- $\alpha$  ha sido extensivamente investigada *in vitro*, pocos estudios se han focalizado en caracterizar la expresión de esta citoquina en tejidos (Girolamo y col., 1997). Si bien, no existen antecedentes previos de cuantificación de las diferentes formas de TNF- $\alpha$  en tejido mamario bovino mediante western blot, ambas formas de la proteína TNF- $\alpha$  (proteína de secreción de 17 kDa y proteína de membrana de 26 kDa) observadas en el presente trabajo, fueron descritas en otras especies como en ratones (Jaskoll y col., 1994), ratas (Borst, y col., 2004) y en ovejas (Daniel y col., 2003).

### 5.3.2. Expresión de IL-1 $\alpha$

La interleuquina 1 es crucial en el proceso inflamatorio causado por endotoxinas e infecciones naturales o experimentales originadas por organismos coliformes en la glándula mamaria bovina o en células epiteliales bovinas *in vitro* (Okada y col., 1997; Shuster y col., 1996, 1997; Persson Waller y col., 2003). Esta citoquina inflamatoria, al igual que TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , puede mejorar la actividad fagocítica y bactericida de los neutrófilos (Sample y Czuprynski, 1991; Sordillo y Babiuk, 1991). Análisis de alineamiento entre la secuencia aminoacídica de la IL-1 $\alpha$  bovina con la IL-1 $\alpha$  humana, murina, y cunícula, indican un alto nivel de homología, encontrándose entre ellas un 73 %, 62 % y 71 %, respectivamente (Alluwaimi, 2004).

Una gran variedad de células han sido identificadas como fuente de IL-1, incluyendo a monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos (Barksby y col., 2007). Agace y col. (1993) encontraron mediante inmunofluorescencia, que la marcación con el anticuerpo anti-IL-1 se localizaba en el citoplasma de células epiteliales y monocitos sanguíneos humanos en cultivo cuando fueron estimuladas con la cepa Hu734 de *E. coli*. Estos hallazgos, concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, ya que como resultado del análisis

inmunohistoquímico para IL-1  $\alpha$ , se encontró que esta proteína se localizaba en el citoplasma de las células epiteliales alveolares y de los conductos excretores, reaccionando intensamente a la inmunomarcación los cuartos mamarios tratados con EPg, placebo y controles. Si bien, no se obtuvieron diferencias significativas en la inmunoexpresión de IL-1 $\alpha$  entre los diferentes tratamientos evaluados, se observó una tendencia en aumento en aquellos cuartos tratados con el EPg a los 7 días del secado. Estos resultados, además, concuerdan con los resultados obtenidos por Kumar y col. (1996), donde se determinó que las células epiteliales alveolares provenientes de otra especie pueden expresar y secretar citoquinas luego de una estimulación. Estos autores encontraron que mediante estudios de RT-PCR semicuantitativa y western blot, luego de estimular con TGF- $\beta$  a células epiteliales alveolares de rata en cultivo, se inducía la expresión de los ARNm y síntesis proteica de las citoquinas IL-1 $\alpha$  e IL-8.

Aunque la IL-1 $\alpha$  usualmente no es secretada, ya que generalmente permanece localizada intracelularmente (Bannerman, 2009), esta puede ser liberada por células lesionadas ó muertas (Dinarello, 1996). Este leve aumento en la inmunoexpresión de IL-1 $\alpha$  encontrado en los cuartos mamarios del presente trabajo puede estar relacionado al aumento de la apoptosis en células mamarias, ya que en un estudio complementario al presente, se observó un incremento de la misma en cuartos inoculados con extractos de *P. ginseng* (Dallard y col., 2011). Además, se ha descrito que la secreción de IL-1 $\alpha$  está ligada a células endoteliales humanas (Miossec y col., 1986), lo cual coincide con lo hallado en el presente trabajo, ya que la inmunoexpresión no sólo se vio vinculada al parénquima mamario, sino que también se expresó en diferentes células del estroma mamario como macrófagos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos.

Por otra parte, en infecciones mamarias por *E. coli* en bovinos, Riollet y col. (2000), encontraron una elevada expresión en los niveles de IL-1, asociada al aflujo elevado de LPMN en el sitio de inflamación. Esto postularía que la IL-1 está directamente relacionada con la quimiotaxis de neutrófilos en infecciones por *E. coli* (Shuster y col., 1997). En este trabajo, se obtuvo un mayor RCS en los cuartos tratados con el EPg, y una inmunoexpresión de IL-1 $\alpha$  no significativa comparada a cuartos inoculados con placebo y cuartos controles, lo que se podría inferir que en los cuartos inoculados con el EPg el reclutamiento en gran cantidad de LPMN en la glándula mamaria no se vio asociada a la expresión de IL-1 $\alpha$  en el tejido.



### 5.3.3. Expresión de IL-6

La interleuquina 6 es una citoquina pleiotrópica, con propiedades pro y antiinflamatorias (Bannerman, 2009). Esta citoquina es expresada por una variedad de células, incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos humanos, y su expresión es inducida por bacterias y virus, así como por otras citoquinas (Biffl y col., 1996; van der Poll y van Deventer, 1998). En el presente estudio, la localización específica de IL-6 se asoció al citoplasma de las células epiteliales de los alvéolos mamarios y de los conductos excretores, donde se observó tinción intensa con el cromógeno utilizado. Además, los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos presentaron tinción positiva. Los porcentajes de inmunomarcación fueron mayores (aunque no significativos) en los cuartos mamarios inoculados con el EPg, comparado con los cuartos inoculados con placebo y los controles sin inoculación.

Se ha demostrado que la IL-1 estimula la producción de otras citoquinas secundarias que amplifican la inflamación, como la IL-6 e IL-8 (Cork y Duff, 1994). En el presente trabajo, los niveles de inmunomarcación de IL-1 $\alpha$  generados por el EPg utilizado, no difirieron con los cuartos con placebo y controles. Podría especularse que estos niveles medios de IL-1 $\alpha$  no provocaron una estimulación elevada de la síntesis de IL-6 en los cuartos inoculados con el inmunomodulador, manteniéndose a niveles moderados e iguales que cuando los cuartos fueron inoculados con placebo ó libres de inoculación.

La IL-6 representa un importante componente de la primera línea de defensa del organismo, actuando en contra de infecciones ó daño tisular (Akira y col., 1993; Nicola y col., 1994). Estudios *in vivo*, donde utilizaron ratones *knockout* (carentes de genes mediante modificación génica), demostraron que cuando los ratones deficientes en IL-6 se desarrollaban normalmente, tenían deterioro en la respuesta inmune y en la síntesis de proteínas de fase aguda (Fattori y col., 1994; Kopf y col., 1994). Se ha postulado que la IL-6 facilita la transición del proceso inflamatorio estimulando el recambio de neutrófilos por monocitos, además de IL-8 y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). Este proceso es esencial para una adecuada respuesta inmune y para disminuir los efectos nocivos que pueda generar la permanencia de los neutrófilos en el sitio de inflamación (Kaplanski y col., 2003). En el presente estudio, el recambio celular

(neutrófilos por macrófagos) fue evaluado mediante la inmunexpresión de CD14 y los resultados arrojan valores significativos en los cuartos tratados con el EPg comparado a cuartos inoculados con placebo y cuartos controles. Considerando que el aumento en la inmunexpresión de IL-6 no fue significativo en cuartos mamarios tratados con el EPg, el recambio de neutrófilos por macrófagos en la glándula mamaria observado en este estudio, no estaría asociado al rol postulado para esta citoquina. Este recambio celular podría estar ligado a otras proteínas como IL-8 ó MCP-1 no evaluadas en el presente trabajo.

#### 5.3.4. Efecto del EPg sobre la cuantificación de monocitos-macrófagos. Expresión de CD14

Las células fagocíticas profesionales, macrófagos y neutrófilos, así como las células epiteliales que actuarían como fagocitos no profesionales, median la remoción de células moribundas y residuos de leche durante el periodo de involución en la glándula mamaria bovina (Monks y col., 2002). El CD14 es el receptor más importante de LPS sobre monocitos-macrófagos y neutrófilos, y está relacionado con la activación de dichas células por ésta molécula. Este receptor, es abundante en la membrana celular de monocitos y macrófagos, y se encuentra en menor proporción en neutrófilos (Sohn y col., 2004). Los macrófagos y LPMN bovinos, expresan CD14 de membrana sobre su superficie celular (Paape y col., 1996). Esta proteína anclada en la membrana facilita también la remoción 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). En estudios realizados por Dallard y col. (2009), en glándulas mamarias infectadas y libres de IIM inoculadas con LPS bacteriano como MRB, se encontraron células inmunopositivas para CD14 en el estroma interalveolar a los días 7, 14 y 21 días del secado. Además, se encontraron células CD14+ a la inmunomarcación en el lumen alveolar y en el interior de los conductos excretores. Los macrófagos inmunopositivos presentaban un gran tamaño, con núcleo pálido y citoplasma vacuolado, con marcación positiva en toda la superficie celular. En el presente estudio, la inoculación con EPg, en cuartos mamarios libres de IIM, produjo un aumento significativo en el número de monocitos-macrófagos al día 7 del secado comparado con los cuartos tratados con placebo y controles sin inoculación,

indicando que el EPg utilizado estimuló el aflujo y reclutamiento de monocitos-macrófagos a la glándula mamaria durante la involución temprana. Estos resultados coincidirían con los hallados por Shin y col., (2002), en donde la expresión de CD14 sobre macrófagos peritoneales murinos, determinada por inmunohistoquímica, se incrementó luego de un tratamiento con EPg.

#### 5.4. Efectos del EPg sobre la expresión de citoquinas en secreción mamaria

Reportes previos han demostrado que macrófagos peritoneales murinos tratados con extractos de *P. ginseng* producen citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IFNs tanto *in vivo* como *in vitro* (Shin y col., 2002). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el extracto de *P. ginseng* utilizado induce la expresión y/o secreción de las citoquinas IL-1 $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-8 y TNF- $\alpha$  en la leche. En este estudio se demostró que el EPg posee la capacidad de producir el reclutamiento de monocitos-macrófagos a la glándula mamaria y posiblemente generar su activación, provocando la consecuente síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias en la secreción mamaria. En contraste a esto, otros autores encontraron que otros extractos de *P. ginseng* diferentes a los utilizados en el presente estudio, poseen efectos antiinflamatorios, tales como la supresión de la expresión de citoquinas proinflamatorias u otros mediadores. En estudios realizados por Ahn y col. (2006), con un polisacárido extraído de *P. ginseng*, ginsang, se encontró que este extracto disminuía la tasa de letalidad en ratones frente a infecciones por *S. aureus*, lo cual fue asociado por los autores a la supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 y IFN- $\gamma$ . Cabe destacar que los diversos efectos inmunológicos descritos sobre *P. ginseng* pueden ser debido a los múltiples efectos de los distintos ginsenósidos u otros de sus componentes activos como los polisacáridos.

Asai y col. (1998), encontraron elevados niveles de ARNm para IL-2 e IL-4 en secreciones mamarias de animales libres de IIM en el periodo no lactante (14 días luego del secado). En el presente trabajo, ARN mensajeros de IL-2, IL-4, IL-6 e INF- $\gamma$  no fueron encontrados en ninguna muestra de secreción mamaria proveniente de la inoculación de cuartos con el EPg y placebo. Las diferencias encontradas entre ambos estudios pueden radicar en las distintas etapas del periodo de involución evaluado.

La IL-1 induce actividades proinflamatorias que incluyen la estimulación de la respuesta de fase aguda (Tracey, 1994). Además esta citoquina presenta efectos específicos quimiotácticos y activadores sobre células fagocíticas (Di Giovine y Duff, 1990; Di Giovine y col., 1991; Dinarello, 1994b). Reportes previos de ensayos realizados *in vitro* encontraron una elevada producción de IL-1 por macrófagos peritoneales luego de su estimulación con 25 µg/ml de ginsenósido Rg1 (Kenarova y col., 1990). En el presente trabajo, se encontró que el EPg indujo un aumento significativo en los niveles de expresión de ARNm para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a las 48 hs PI en secreción mamaria. Este brusco incremento en los niveles de ARNm a las 48 hs PI con un consiguiente descenso de los mismos a las 72 hs PI podría ser el resultado del incremento concomitante de las células somáticas en los cuartos tratados con el EPg en dichos periodos.

La IL-8 bovina ha sido detectada en glándulas mamarias, tanto libres de infección como infectadas (Alluwaimi, 2004). Si bien, la dosis del EPg aplicada en el presente trabajo estimuló la expresión de ARNm de IL-8 por parte de las células somáticas recolectadas en la leche a las 24 y 48 hs PI, no se encontraron diferencias significativas entre los cuartos tratados con el EPg y placebo. Sonoda y col. (1998) sugieren que si bien, los macrófagos activados producen una variedad de citoquinas inflamatorias, se considera que la IL-8 es un indicadora sensible de la activación de macrófagos y un elemento útil para la evaluación de modificadores de la respuesta biológica en diversas enfermedades. Además estos autores encontraron que el ginsenano S-IIA, un polisacárido extraído de *P. ginseng*, funcionaba como un potente inductor de la síntesis de IL-8 por monocitos humanos. La diferencia en los niveles de expresión de la IL-8 encontrada entre el trabajo de Sonoda y col. (1998) y el presente trabajo, puede deberse no solo al modelo experimental utilizado, sino también, a las diferencias en la naturaleza química del extracto inoculado. El EPg empleado en este trabajo fue extraído por métodos en los cuales los polisacáridos hidrosolubles son removidos. Por lo tanto, en el presente estudio es posible descartar los efectos que causarían los polisacáridos sobre la producción de la IL-8.

En desafíos experimentales donde se inocularon cuartos por vía intramamaria con una cepa P4 de *E. coli*, se detectó que las concentraciones de IL-8 en leche medidas por enzimoimmunoanálisis (ELISA) se incrementaban a partir de las 16 hs de la inoculación (Lee y col., 2003; Riollot y col., 2000). En trabajos similares utilizando una cepa de *E.*

*coli* diferente, la concentración de IL-8 en leche se encontraba incrementada entre las 18 y 24 hs luego de la infección (Shuster y col, 1996, 1997). En cambio, en otros estudios usando cepas de *Streptococcus uberis*, el incremento de los niveles de IL-8 en leche no fue detectado antes de las 30 hs y hasta las 66 hs de la infección (Rambeaud y col., 2003); mientras que cuando se inocularon glándulas mamarias con *Mycoplasma bovis* el incremento de IL-8 sólo se detectó a partir del día 5 de la infección (Bannerman y col., 2009). Estos resultados indican que los incrementos de los niveles de IL-8 pueden variar de acuerdo con el agente patógeno o tipo de estímulo utilizado; por lo tanto en el presente estudio, los niveles de esta citoquina podrían haber sufrido modificaciones luego del periodo de observación analizado (72 hs PI).

El TNF- $\alpha$  es producido primariamente por monocitos-macrófagos y células T (Bondeson, 1997), y presenta efectos proinflamatorios sobre una gran variedad de células. Además se comporta como un potente activador de macrófagos, puede estimular la producción o expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, prostaglandina E2, colagenasa tipo I y II, moléculas de adhesión y se considera como un factor de crecimiento de linfocitos T y B (Bondeson, 1997). Esta citoquina ejerce un profundo efecto sobre la remodelación tisular, reparación y la inflamación mediante la coordinación de las actividades de muchas células, como células endoteliales, granulocitos, fibroblastos, y células linfoides (Larrick y Kunkel, 1988). En el presente trabajo, los niveles de transcripción de ARNm para TNF- $\alpha$  presentaron un pico a las 48 hs PI en secreción mamaria proveniente de cuartos inoculados con el EPg, con una disminución significativa a las 72 hs PI, lo cual coincidió con el incremento del RCS, indicando que el TNF- $\alpha$  juega un rol fundamental en la activación y reclutamiento de leucocitos en secreción mamaria (Persson y col., 1996).

### **5.5 Transferencia de los resultados hallados**

Una de las alternativas más prometedoras a los clásicos tratamientos con antibióticos es el uso de inmunomoduladores ó MRB para aumentar la respuesta de las defensas del hospedador (Tzianabos, 2000). Los datos obtenidos en el presente trabajo aportan no solamente nuevos conocimientos a cerca de la aplicación de tratamientos alternativos que pueden ser de utilidad en las condiciones de manejo actuales en rodeos lecheros, sino también información a cerca de mecanismos relacionados con la

inmunidad innata que tienen lugar durante la involución fisiológica de la glándula mamaria bovina. El efecto estimulante del extracto utilizado sobre las defensas innatas de la glándula mamaria se ha comprobado en cada punto discutido. En primer lugar, el producto utilizado generó un aumento de células somáticas que permaneció constante en el tiempo de evaluación independientemente del aumento normal que se produce al momento del secado y sin generar efectos adversos en la glándula mamaria. Además, el extracto no generó cambios en la renovación celular normal de la glándula mamaria en involución, sin embargo provocó el aflujo de monocitos-macrófagos a la misma y la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias. Considerando lo anteriormente expuesto y tomando el conjunto de resultados obtenidos, se percibe que la administración intramamaria del extracto de *Panax ginseng* produce un efecto estimulante de las defensas inespecíficas de la glándula mamaria, sugiriendo que podría utilizarse como posible MRB, con el objetivo de aumentar la resistencia a las infecciones bacterianas durante el periodo de secado. Cabe destacar que la información generada en este trabajo hasta la fecha es inédita ya que no se han reportado antecedentes de la utilización intramamaria de *Panax ginseng* como inmunoestimulante o MRB en bovinos, lo que abre posibilidades para transferir estos resultados a la industria farmacéutica.

#### **5.6. Método directo de conteo de células somáticas de leche como alternativa a la citometría de flujo**

El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante (Wolter y Kloppert, 2004). La mastitis es uno de los factores de mayor influencia en el RCS de la leche (Harmon, 2001). El RCS proveniente de secreciones de cuartos mamarios libres de IIM es usualmente menor a 200.000 células/ml y es frecuente observar animales que mantienen valores de recuento menores a 100.000 células/ml. Cuando las bacterias causantes de mastitis invaden la glándula mamaria, los macrófagos presentes en la misma alertan al sistema inmunológico del animal estimulando el aflujo de neutrófilos al sitio de infección, lo que conduce a la eliminación del agente infeccioso. Más del 90% del RCS en glándulas infectadas está compuesto de LPMN, mientras que los macrófagos y linfocitos forman parte de un 2-10 % del RCS. En cuanto a las células

epiteliales, tanto en leche de animales sanos, como de animales con mastitis subclínica, el porcentaje de este tipo celular es de un 0-7% del RCS (Lee y col., 1980).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se condicen con los hallazgos previos (Lee y col., 1980). Por el método directo, el porcentaje de LPMN aumenta proporcionalmente al aumento del RCS, y cuando el valor del RCS supera las 100.000 células/ml, el porcentaje de células epiteliales y leucocitos mononucleares disminuye drásticamente en comparación al porcentaje de LPMN. Similares resultados se encontraron en la identificación celular mediante marcación de antígenos por CF, ya que cuando el valor del RCS superó las 100.000 células /ml, el porcentaje de células AE1-AE3+ (células epiteliales) y células CD14+ (monocitos-macrófagos) disminuyó drásticamente.

En el presente trabajo, el método directo de conteo de células somáticas no resultó adecuado para secreciones mamarias con altos RCS, debido a que las correlaciones evaluadas entre las dos técnicas no fueron significativas. En cambio, cuando se consideraron solamente muestras con bajo RCS, se obtuvieron diferencias significativas en las correlaciones evaluadas por ambas técnicas. Esto demuestra que la técnica directa aquí evaluada, como método para identificar células somáticas en leche con bajo RCS, puede ser una herramienta valiosa como alternativa a la CF. A partir de estas observaciones, se destaca la necesidad de evaluar por ambas técnicas muestras de leche con RCS progresivamente superiores para determinar en que valores las correlaciones dejan de ser significativas.

Numerosos son los métodos descritos para el conteo directo de células, dentro de los que se encuentran el conteo por Microscopía óptica directa, y los contadores electrónicos y computarizados, como el Fossomatic (Foss Electric, Dinamarca) y el Counter Coulter (Coulter, Inglaterra) (Saran y Chaffer, 2000; Bedolla y col., 2007). Los procedimientos de conteo electrónico tienen numerosas ventajas. Primeramente, pueden automatizarse, permitiendo la centralización de procedimientos del laboratorio; pueden contarse las muestras conservadas, y el procedimiento tiende a ser más preciso y objetivo. Las desventajas de los procedimientos de RCS electrónicos son que el equipo es caro y requiere la constante supervisión y calibración periódica del equipo (Gilson, 1995). Por dicha razón, la técnica de conteo directo desarrollada en el presente trabajo podría ser utilizada como herramienta para la identificación celular mediante el uso de otros anticuerpos que estén dirigidos a otros marcadores celulares, no solo marcadores

citoplasmáticos, sino también a marcadores nucleares, y de superficie. Como una alternativa a la CF, la combinación de esta técnica, optimizada con el uso de sistemas de análisis de imágenes y el RCS permitiría contar con información cuantitativa sobre las variaciones de diferentes tipos celulares en la leche bovina, sin necesidad de recurrir a equipos costosos y técnicas laboriosas como es el caso de la CF. Además, permitiría su combinación no solo con IHQ, si no también con hibridación *in situ*, posibilitando el estudio de células que expresen el ARNm de diferentes genes.



## ***6. CONCLUSIONES***

---

- La dosis elegida del EPg utilizado en el presente trabajo generó un aumento significativo en el RCS a partir de las 24 hs PI que se mantuvo elevado hasta el final del muestreo.
- El EPg utilizado solo causó cambios macroscópicos en secreciones mamarias a las 24 hs PI y se observó inflamación moderada en la glándula de cuartos mamarios tratados con EPg en el periodo evaluado.
- Durante la involución en cuartos mamarios, tanto en aquellos tratados con el EPg como con placebo y cuartos controles, no se detectaron diferencias en la proliferación de células epiteliales y estromales evaluada con PCNA, determinando que en la etapa temprana de involución, periodo evaluado en el presente trabajo, el tratamiento con EPg no afectó el proceso de recambio celular.
- En cuartos mamarios tratados con el EPg se produjo un incremento significativo en la inmunomarcación de TNF- $\alpha$  en comparación con cuartos tratados con placebo y control al día 7 del secado.
- No se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de áreas inmunomarcadas para IL-1 $\alpha$  e IL-6 para los diferentes tratamientos evaluados, sin embargo, para ambas citoquinas se encontró un leve aumento de la expresión de las mismas en cuartos tratados con el EPg comparado a cuartos tratados con placebo y cuartos controles.
- El tratamiento con EPg en cuartos libres de IIM produjo un incremento significativo en el número de monocitos-macrófagos durante el periodo de involución evaluado con respecto a cuartos tratados con placebo y a cuartos controles, determinando que el extracto utilizado produjo el reclutamiento de este tipo celular a la glándula mamaria.

- El tratamiento con EPg provocó un aumento significativo de la proteína TNF- $\alpha$  de secreción (17 kDa) a las 24 y 48 hs PI en muestras de leche. En muestras de tejido mamario se encontraron diferencias significativas en la expresión de la proteína TNF- $\alpha$  de membrana (26 kDa) en cuartos mamarios tratados con EPg comparado a cuartos con placebo y controles.
- En el presente trabajo se detectó la síntesis y secreción de citoquinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF- $\alpha$  por parte de células somáticas en secreción mamaria de cuartos inoculados con EPg y placebo. No se detectaron los correspondientes ARNm para las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6 e INF- $\gamma$  en secreción mamaria de los cuartos inoculados para los distintos tratamientos, aunque si se detectaron en muestras de tejido consideradas como control (ganglio linfático bovino).
- El EPg indujo un aumento significativo en los niveles de expresión de ARNm para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  a las 48 hs PI en secreción mamaria en comparación a los niveles encontrados en cuartos mamarios tratados con placebo.
- El EPg no generó diferencias significativas en los niveles de ARNm relativos de IL-8 comparado a cuartos tratados con placebo, aunque si hubo una tendencia en aumento en cuartos tratados con EPg a las 24 y 48 hs PI.
- El método directo de conteo de células somáticas no resultó óptimo para secreciones mamarias con altos RCS, en cambio, si resultó óptimo cuando no se consideraron muestras con bajos y moderados RCS. Esto demuestra que la técnica directa aquí realizada, como método para identificar células somáticas en leche con bajos y moderados RCS, puede ser una herramienta valiosa como alternativa a la CF, cuando no se disponen de los medios necesarios para su realización.

Teniendo en cuenta estas conclusiones se podría proponer que el extracto aplicado (*P. ginseng*) jugaría un papel importante en la mejora de las defensas intramamarias para el control de mastitis al momento del secado, ya sea usándolo solo o en combinación con la terapia antibiótica.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, en conjunto con otros estudios que nos permitan establecer el mecanismo de acción del EPg aquí empleado como posible MRB, podrían aportar mayor información para incentivar el desarrollo de nuevas estrategias de refuerzo de agentes protectores nativos de la glándula mamaria bovina en el periodo de secado. Esto permitiría evitar el uso de antibióticos, mejorando de esta forma la calidad de los subproductos pecuarios al reducir residuos en leche y evitando la generación de resistencia en microorganismos que lleva a dificultades en tratamientos específicos.

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

---

- Agace, W.; Hedges, S.; Andersson, U.; Andersson, J.; Ceska, M.; y Svanborg, C. (1993). *Selective Cytokine Production by Epithelial Cells following Exposure to Escherichia coli*. Infect. Immun. 61:602-609.
- Ahn, J.Y.; Song, J.Y.; Yun, Y.S.; Jeong, G. y Choi, I.S. (2006). *Protection of Staphylococcus aureus-infected septic mice by suppression of early acute inflammation and enhanced antimicrobial activity by ginsan*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46:187-197.
- Akira, S.; Taga, T. y Kishimoto, T. (1993). *Interleukin-6 in biology and medicine*. Adv. Immunol. 54:1-78.
- Allan, C.R. y Hadwiger, L.A. (1979). *The fungicidal effects of chitosan on fungi and varying in cell wall composition*. Exp. Mycol. 3:285-287.
- Alluwaimi, A.M. (2004). *The cytokine of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy*. Res. Vet. Sci. 77:211-222.
- Alluwaimi, A.M. y Cullor, J.S. (2002). *Cytokines gene expression patterns of bovine milk during mid and late stages of lactation*. J. Vet. Med. B. 49:105-110.
- Almas, K. (1999). *The antimicrobial effects of Azadirachta indica (Neem) and Salvadora persica (Arak) chewing sticks*. Indian J. Dental Res. 10:23-26.
- Amweg, A.N.; Paredes, A.; Salvetti, N.R.; Lara, H.E. y Ortega, H.H. (2010). *Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary*. Theriogenology. En prensa. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.10.003
- Anderson, D.C. y Springer, T.A. (1987). *Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150, 95 glycoproteins*. Annu. Rev. Med. 38:175-194.
- Asai, K.; Kai, K.; Rikiishi, H.; Sugawara, S.; Maruyama, Y.; Yamaguchi, T.; Ohta, M. y 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.
- Attele, A.S.; Wu, J.A. y Yuan, C.S. (1999). *Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions*. Biochem. Pharmacol. 58:1685-1693.

- Babior, B. M. (1984). *The respiratory burst of phagocytes*. J. Clin. Invest. 73:599-601.
- Babiuk, L.A.; Sordillo, L.M.; Campos, M.; Hughes, H.P.; Rossi-Campos, A. y Harland, R. (1991). *Application of interferons in the control of infectious diseases of cattle*. J. Dairy Sci. 74:4385-4398.
- Baggiolini, M.; Walz, A. y Kunkel, S.L. (1989). *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils*. J. Clin. Invest. 84:1045-1049.
- Bannerman, D.D. (2009). *Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows*. J. Anim. Sci. 87:10-25.
- Bannerman, D.D.; Chockalingam, A.; Paape, M.J. y Hope, J.C. (2005). *The bovine innate immune response during experimentally-induced Pseudomonas aeruginosa mastitis*. Vet. Immunol. Immunopathol. 107:201-215.
- Bannerman, D.D.; Paape, M.J.; Hare, W.R. y Hope, J.C. (2004a). *Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with Klebsiella pneumoniae*. J. Dairy Sci. 87:2420-2432.
- Bannerman, D.D.; Paape, M.J.; Lee, J.W.; Zhao, X.; Hope, J.C. y Rainard, P. (2004b). *Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11:463-472.
- Baravalle, C.; Salvetti, N.R.; Mira, G.A.; Lorente, J.A. y Ortega, H.H. (2007). *The Role of ACTH in the Pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in Rats: Hormonal Profiles and Ovarian Morphology*. Physiol. Res. 56:67-78.
- Baravalle, C.; Salvetti, N.R.; Mira, G.A.; Pezzone, N. y Ortega, H.H. (2006). *Microscopic Characterization of Follicular Structures in Letrozole -induced Polycystic Ovarian Syndrome in the Rat*. Arch. Med. Res. 37:830-839.
- Barksby, H.E.; Lea, S.R.; Preshaw, P.M. y Taylor, J.J. (2007). *The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders*. Clin. Exp. Immunol. 149:217-225.

- Basolo, F.; Conaldi, P.; Fiore, L.; Calvo, S. y Toniolo, A. (1993). *Normal breast epithelial-cells produce interleukin-6 and interleukin-8 together with tumor-necrosis-factor-defective IL6 expression in mammary-carcinoma*. Int. J. Cancer. 55:926-930.
- Baumann, H. y Gauldie, J. (1994). *The acute phase response*. Immunol. Today 15:74-80.
- Bedolla, C.C.; Castañeda, V.H. y Wolter, W. (2007). *Métodos de detección de la mastitis bovina*. REDVET. Rev. Electrón. Vet. 8:17.
- Biffl, W.L.; Moore, E.E.; Moore, F.A. y Peterson, V.M. (1996). *Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation?* Ann. Surg. 224:647-664.
- Biswas, K.; Chattopadhyay, I.; Banerjee, R.K. y Bandopadhyay, U. (2002). *Biological activities and medicinal properties of neem (Azadirachta indica)*. Curr. Sci. India. 82:1336-1345.
- Blum, J.W.; Dosogne, H.; Hoeben, D.; Vangroenweghe, F.; Hammon, H.M.; Bruckmaier, R.M. y Burvenich, C. (2000). *Tumor necrosis factor-alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by Escherichia coli infection and endotoxin in dairy cows*. Domest. Anim. Endocrinol. 19:223-235.
- Bondeson, J. (1997). *The mechanisms of action of disease-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines*. General Pharmacology: The Vascular System. 29:127-150.
- Borst, S.E.; Lee, Y.; Conover, C.F.; Shek, E.W. y Bagby, G.J. (2004). *Neutralization of tumor necrosis factor- $\alpha$  reverses insulin resistance in skeletal muscle but not adipose tissue*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 287:934-938.
- Boudjellab, N.; Chan-Tang, H.S. y Zhao, X. (2000). *Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin- 8*. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 127:191-199.



- Brown, W.C.; Rice-Ficht, A.C.; Estes, A.C. y Estes, D.M. (1998). *Bovine type 1 and type 2 responses*. Vet. Immunol. Immunopathol. 63:45-55.
- Burvenich, C.; Paape, M.J.; Hill, A.W.; Guidry, A.J.; Miller, R.H.; Heyneman, R.; Kremer, W.D.J. y Brand, A. (1994). *Role of the neutrophil leukocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced E. coli mastitis in cows immediately after calving*. Vet. Q. 16:45-49.
- Campos, M.; Godson, D.; Hughes, H.; Babiuk, L. y Sordillo, L. (1993). *The role of biological response modifiers in disease control*. J. Dairy Sci. 76:2407-2412.
- Cantiello, M.; Carletti, M.; Cannizzo, F.T.; Nebbia, C.; Bellino, C.; Pié, S.; Oswald, I.P.; Bollo, E. y Dacasto, M. (2007). *Effects of an illicit cocktail on serum immunoglobulins, lymphocyte proliferation and cytokine gene expression in the veal calf*. Toxicology. 242:39-51.
- Capuco, A.V.; Akers, R.M. y Smith, J.J. (1997). *Mammary growth in holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology*. J. Dairy Sci. 80:477-487.
- Carter, D.B.; Deibel, M.R.; Dunn, C.J.Jr; Tomich, C.S.; Laborde, A.L.; Slightom, J.L.; Berger, A.E.; Bienkowski, M.J.; Sun, F.F. y McEwan, R.N. (1990). *Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein*. Nature. 344:633-638.
- Castrucci, G.; Ferrari, M.; Osburn, B.I.; Frigeri, F.; Barreca, F.; Tagliati, S. y Cuteri, V. (1996). *Experience with an immunomodulator*. En: 14th Symp. World Assoc. Vet. Microbiol. Immunol. and Specialists. Infect. Dis. Edinburgh, Scotland UK. World Assoc. Vet. Microbiol. Immunol., Edinburgh, Scotland UK, p. 209.
- Chen, Y.G. y Zhang, Y. (2001). *Chemistry of dammarane-type ginsenosides*. J. Yunnan. Normal Univ. 21:39-42.
- Chou, W.K.; Yu, T.C.; Chen, S.E.; Peh, H.C.; Liu, W.B.; Chen, M.T.; Nagahata, H. y Chang, C. (2009). *TNF-mediated plasminogen activation on neutrophils is involved in the high plasmin activity in mammary secretion of drying-off cows*. J. Dairy Res. 76:459-468.

- Colditz, I.G. (1988). *Studies on the inflammatory response during involution of the ovine mammary gland*. Q. J. Exp. Physiol. 73:363-368.
- Concha, C.; Hu, S. y Holmberg, O. (1996). *The proliferative responses of cow stripping milk and blood lymphocytes to pokeweed mitogen and ginseng in vitro*. Vet. Res. 27:107-115.
- Coppock, C.E.; Everet, R.W.; Natzke, R.P. y Ainslie, H.R. (1974). *Effect of dry period length on holstein milk production and select disorders at parturition*. J. Dairy Sci. 57:712-718.
- Corbellini, C.N. (1998). *Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina*. En: Memorias Primer Seminario Internacional CAPACITAGRO Gerenciamiento para la Obtención de Leche bajo los Principios de Calidad Total, Pergamino, Argentina, 14-18 Julio 1998, p. 49-66.
- Cork, M.J. y Duff, G.W. (1994). *Interleukin-1*. En: Epidermal Growth Factors and Cytokines. (Eds. Luger, T.A., Schwarz, T.), Marcel Dekker, New York, p. 19-48.
- Craven, N. y Williams, M.R. (1985). *Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancements*. Vet. Immunol. Immunopathol. 10:71-127.
- Crewther, W.G.; Dowling, L.M.; Steinert, P.M. y Parry, D.A.D. (1983). *Structure of intermediate filament*. Int. J. Biol. Macromol. 5:267-274.
- Daley, M.J.; Coyle, P.A.; Williams, T.J.; Furda, G.; Dougherty, R. y Hayes, P.W. (1991). *Staphylococcus aureus mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 beta and interleukin-2*. J. Dairy Sci. 74:4413-4429.
- Daley, M.J.; Williams, T.J.; Coyle, P.A.; Furda, G.; Dougherty, R. y Hayes, P. (1990). *Role of cytokines in the pathophysiology and therapy of bovine mastitis*. En: Int. Congr. Inflammation, Barcelona, Spain, p. 62.
- Dallard, B.E.; Baravalle, C.; Andreotti, C.; Ortega, H.H.; Neder, V. y Calvinho, L.F. (2011). *Intramammary inoculation of Panax ginseng extract on cows at drying off enhances early mammary involution*. Journal of Dairy Research. 78:63-71.

- Dallard, B.E.; Baravalle, C.; Ortega, H.; Ruffino, V.; Heffel, S. y Calvinho, L.F. (2008). *Effect of a biological response modifier on cellular death mechanisms at drying off*. J. Dairy Res. 75:167-175.
- Dallard, B.E.; Baravalle, C.; Ortega, H.H.; Tumini, M.; Canavesio, V.R.; Neder, V.E. y Calvinho, L.F. (2009). *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. Immunop. 132:237-242.
- Daniel, J.A.; Elsasser, T.H.; Morrison, C.D.; Keisler, D.H.; Whitlock, B.K.; Steele, B.; Pugh, D. y Sartin, J.L. (2003). *Leptin, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), and CD14 in ovine adipose tissue and changes in circulating TNF in lean and fat sheep*. J. Anim. Sci. 81:2590-2599.
- Darmadji, P. y Izumimoto, M. (1994). *Effect of chitosan in meat preservation*. Meat. Sci. 38:243-254.
- de Vries, J.E. (1995). *Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10*. Ann. Med. 27:537-541.
- Dellmann, H.D. (1994). *Histología Veterinaria*. Segunda Edición. Zaragoza, España, p. 323-353.
- Detmers, P.A.; Powell, D.E.; Walz, A.; Clark-Lewis, I.; Baggionlini, M. y Cohn, Z.A. (1991). *Differential effects of neutrophil-activating peptide/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis*. J. Immunol. 147:4211-4217.
- Di Giovine, F.S. y Duff, G.W. (1990). *Interleukin-1: the first interleukin*. Immunol. Today 11:151-152.
- Di Giovine, F.S.; Symons, J.A. y Duff, G.W. (1991). *Kinetics of IL-1 beta mRNA and protein accumulation in human mononuclear cells*. Immunol. Lett. 29:211-218.
- Diamond, G.; Zasloff, M.; Eck, H.; Brasseur, M.; Maloy, W.L. y Bevins, C.L. (1991). *Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 3952-3956.
- Dinarello, C.A. (1994b). *Interleukin-1*. Adv. Pharmacol. 25:21-51.

- Dinareello, C.A. (1995). *Controlling the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disease*. Nutrition. 11:695-697.
- Dinareello, C.A. (1996) *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood. 87:2095-2147.
- Dinareello, C.A. y Moldawer, L.L. (1999). *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians*. Amgen, Thousand Oaks, CA, USA, p. 2971–2980.
- Dinareello, C.A. (1994a). *The interleukin-1 family: ten years of discovery*. FASEB J. 8:1314-1325.
- Dosogne, H.; Vangroenweghe, F.; Mehrzad, J.; Massart-Leen, A.M. y Burvenich, C. (2003). *Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk*. J. Dairy Sci. 86:828-834.
- Duffield, J.S. (2003). *The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde*. Clin. Sci. 104:27-38.
- Dulin, A.M.; Paape, M.J. y Weinland, B.T. (1982). *Cytospin Centrifuge in Differential Counts of Milk Somatic Cells*. J. Dairy Sci. 65:1247-1251.
- Eckersall, P.D.; Young, F.J.; McComb, C.; Hogarth, C.J.; Safi, S.; Weber, A.; McDonald, T. ; Nolan A.M. y Fitzpatrick J.L. (2001). *Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis*. Vet. Rec. 148:35-41.
- Faimboim, L. y Geffner, J. (2008). *Introducción a la inmunología humana*. 5ta. Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, p. 51-88.
- Fattori, E.; Cappelletti, M.; Costa, P.; Sellitto, C.; Cantoni, L.; Carelli, M.; Faggioni, R.; Fantuzzi, G. y Ghezzi, P. (1994). *Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice*. J. Exp. Med. 180:1243-1250.
- Federation of Animal Sciences Societies (FASS). (1999). *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*.
- Fernández Botran, R.; Chilton, P.M. y Ma, Y. (1996). *Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy*. Adv. Immunol. 63:269-336.

- Fitzpatrick, J.L.; Cripps, P.J.; Hill, A.W.; Bland, P.W. y Stokes, C.R. (1992). *MHC class II expression in bovine mammary gland*. Vet. Immunol. Immunopathol. 32:13-23.
- Gao, X.S. (2000). *Trial-explanation of the name "Renshen"*. J. Chin. Med. Literature 1:22-23.
- Geneser, F. (2007). *Histología*. 3era edición 7ª reimpresión. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, p. 235-256.
- Gillis, C.N. (1997). *Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link?* Biochem. Pharmacol. 54:1-8.
- Girolamo, N.D; Visvanathan, K.; Lloyd, A. y Wakefield, D. (1997). *Expression of TNF- $\alpha$  by human plasma cells in chronic inflammation*. J. Leukocyte Biol. 61:667-678.
- Goff, J.P. y Horst, R.L. (1997). *Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders*. J. Dairy Sci. 80:1260-1268.
- Goff, W.L.; Johnson, W.C. y Cluff, C.W. (1998). *Babesia bovis Immunity: In vitro and in vivo evidence for IL-10 regulation of IFN and iNOS*. Ann. of the New York Acad. Scie. 849:161-180.
- Gronlund, U.; Hallen Sandgren, C. y Persson Waller, K. (2005). *Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic subclinical mastitis*. Vet. Res. 36:191-198.
- Guidry, A.J. y Miller, R.H. (1986). *Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity*. J. Dairy Sci. 69:1799-1805.
- Gupta, R.K.; Griffin, P.; Echenchang, J.R.; Rivera, R.; Anderson, R.; Rots, B. y Cecchini, P. (1995). *The role of adjuvant and delivery*. En: *Systems in modulation of immune response to Vaccine, novel strategies in design and production of vaccines*. Plenum Press, New York, p.105-113.
- Han, S.H.; Kim, J.H.; Martin, M.; Michalek, S.M. y Nahm, M.H. (2003). *Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2*. Infect. Immun. 71:5541-5548.

- Hancock, J.T.; Salisbury, V.; Ovejero-Boglione, M.C.; Cherry, R.; Hoare, C.; Eisenthal, R. y Harrison, R. (2002). *Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3308-3310.
- Hannum, C.H.; Wilcox, C.J.; Arend, W.P.; Joslin, F.G.; Dripps, D.J.; Heimdal, P.L.; Armes, L.G.; Sommer, A.; Eisenberg, S.P. y Thompson, R.C. (1990). *Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor*. *Nature.* 343:336-340.
- Harda, A.; Sekido, N.; Akahoshi, T.; Wada, T.; Mukaida, N. y Matsushima, K. (1994). *Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation*. *J. Leukocyte Biol.* 56:559-564.
- Harmon, R.J. (2001). *Somatic cell counts: a primer*. En: Proc. Natl. Mastitis Coun. 40th Annual Meeting, Feb 11-14, Reno, NV, p. 3-9
- Hein, W.R. y Mackay, C.R. (1991). *Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system*. *Immunology Today.* 12:30-34.
- Henderson, B. y Bodmer, M. (1996). *In Therapeutic modulation of cytokines*. En: Boca Raton: CRC Press, p. 81-90.
- Henderson, B. y Poole, S. (1994). *Modulation of cytokine function: therapeutic applications*. *Adv. Pharmacol.* 25:53-115.
- Henderson, B.; Poole, S. y Wilson, M. (1996). *Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network?* *Immunopharmacol.* 1:1-21.
- Hisaeda, K.; Hagiwara, K.; Eguchi, J.; Yamanaka, H.; Kirisawa, R. y Iwai, H. (2001). *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis*. *J. Vet. Med. Sci.* 63:1009-1011.
- Ho, L.J.; Juan, T.Y.; Chao, P.; Wu, W.L.; Chang, D.M.; Chang, S.Y. y Lai, J.H. (2004). *Plant alkaloid tetrandrine downregulates IkappaBalpha kinases- IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathway in human peripheral blood T cell*. *Br. J. Pharmacol.* 143:919-927.
- Hoeben, D.; Burvenich, C.; Trevisi, E.; Bertoni, G.; Hamann, J.; Blum, R.M. y Blum, J.W. (2000). *Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of*

- experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows*. J. Dairy Sci. 67:503-514.
- Hogan, J.S.; Harmon, R.J.; González, R.N.; Nickerson, S.C.; Oliver, S.P.; Pankey, J.W. y Smith, K.L. (1999). *Laboratory handbook on bovine mastitis*. National Mastitis Council, Madison, WI, p. 222.
- Holst, B.D.; Hurley, W.L. y Nelson, D.R. (1987). *Involution of the bovine mammary gland: histological and ultrastructural changes*. J. Dairy Sci. 70:935-944.
- Hope, J.C.; Whelan, A.O.; Hewinson, R.G.; Vordemeier, M. y Howard, C.J. (2003). *Maturation of bovine dendritic cells by lipopeptides*. Vet. Immunol. Immunopathol. 95:21-31.
- Hornef, M.W.; Wick, M.J.; Rhen, M. y Normark, S. (2002). *Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptative immune responses*. Nat. Immunol. 3:1033-1040.
- Hu, S. (2002). *Inmunomodulatory and adjuvant effect of ginseng extracts with emphasis on defence mechanisms of the bovine udder*. Doctoral thesis. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Uppsala, p. 20-29.
- Hu, S.; Concha, C.; Cooray, R. y Holmberg, O. (1995). *Ginseng-enhanced oxidative and phagocytic activities of polymorphonuclear leucocytes from bovine peripheral blood and stripping milk*. Vet. Res. 26:155-161.
- Hu, S.; Concha, C.; Jahannisson, A.; Meglia, G. y Waller, K.P. (2001) *Effect of Subcutaneous injection of Ginseng on cows with subclinical Staphylococcus aureus mastitis*. J. Vet. Med. 48:519-528.
- Hurley, W.L. (1989). *Mammary gland function during involution*. J. Dairy Sci. 72:1637-1646.
- Hurley, W.L.; McKee, T.M. y Cue, D.R. (1987). *Lysosomal enzymes in bovine mammary leukocytes during the no lactating period*. Vet. Immunol. Immunopathol. 16:95-105.
- Inchaisri, C.; Persson-Waller, K. y Jahannisson, A. (2000). *Studies on the modulation of leukocytes subpopulations and immunoglobulins following intramammary infusion*

- of B 1,3-glucan into the bovine udder during the dry period. J. Vet. Med. B. 47:373-386.*
- Ip, M.M.; Shoemaker, S.F. y Darcy, K.M. (1992). *Regulation of rat mammary epithelial cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$* . *Endocrinology* 130:2833-2844.
- Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M. y Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology: The immune system in health and disease* (Eds: Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M), Garland Publishing, New York, p. 635.
- Jaskoll, T.; Boyer, P.D. y Melnick, M. (1994). *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and embryonic mouse lung morphogenesis*. *Dev. Dynam.* 201:137-150.
- Jensen, D.L. y Eherhart, R.J. (1981). *Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland*. *Am. J. Vet. Res.* 42:743-747.
- Jinquan, T.; Deleyran, B.; Gesser, B.; Maare, H.; Delevran, M.; Larsen, C.G. y Thestrup-Pederson, K. (1995). *Regulation of human T-lymphocyte chemotaxis in vitro by T-cell derived cytokines IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, and IL-13*. *J. Immunol.* 154:3742-3752.
- Jungi, T.W.; Valentin-Weigand, P. y Brcic, M. (1999). *Differential induction of NO synthesis by gram-positive and gram-negative bacteria and their components in bovine monocytederived macrophages*. *Microb. Pathog.* 27:43-53.
- Kaplanski, G.; Marin, V.; Montero-Julian, F.; Mantovani, A. y Farnarier, C. (2003). *IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation*. *Trends Immunol.* 24:25-29.
- Kehrli, M.E.; Cullor, J.S. y Nickerson, S.C. (1991). *Immunobiology of hematopoietic colony stimulating factors: potential application to disease prevention in the bovine*. *Dairy Sci.* 74:4399-4412.
- Kelso, A. (1989). *Cytokines: structure, function and synthesis*. *Curr. Opin. Immunol.* 2:215-225.
- Kenarova, B.; Neychev, H.; Hadjiivanova, C. y Petkov, V.D. (1990). *Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from Panax ginseng*. *Jpn. J. Pharmacol.* 54:447-454.



- Kimura, K.; Goff, J.P.; Kehrli Jr.M.E. y Harp, J.A. (1999). *Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows*. J. Dairy Sci. 82:315-319.
- King, J.S. (1981). *Streptococcus Uberis: A review of its role as a causative organism of bovine mastitis II. Control of infection*. Br. Vet. Journal. 137:160-165.
- Kopf, M.; Baumann, H.; Freer, G.; Freudenberg, M.; Lamers, M.; Kishimoto, T, Zinkernagel, R.; Bleuthmann, H. y Kohler, G. (1994). *Impaired immune and acute phase responses in interleukin-6-deficient mice*. Nature. 368:339-342.
- Kumar, N.D.; Rabadi, N.H.; Sigurdson, L.S.; Schunemann, H.J. y Lwebuga-Mukasa, J.S. (1996). *Induction of interleukin-1 and interleukin-8 mRNAs and proteins by TGF beta 1 in rat lung alveolar epithelial cells*. J. Cell. Physiol. 169:186-199.
- Lahouassa, H.; Moussay, E.; Rainard, P. y Riollet, C. (2007). *Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Cytokine. 38:12-21.
- Landmann, R.; Ludwig, C.; Obrist, R. y Obrecht, J.P. (1991). *Effect of cytokines and lipopolysaccharide on CD14 antigen expression in human monocytes and macrophages*. J. Cell. Biochem. 47:317-325.
- Larrick, J.W. y Kunkel, S.L. (1988). *The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response*. Pharm Res. 5:129-139.
- Lee, C.S.; McCauley, I. y Hartmann, P.E. (1983). *Light and electron microscopy of cells in pig colostrum, milk and involution secretion*. Acta Anat. 116:126-135.
- Lee, C.S.; Wooding, F.B.P. y Kemp, P. (1980). *Identification properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrums and milk from normal cows*. J. Dairy Res. 47:39-50.
- Lee, E.K. y Kehrli, M.E.Jr. (1998). *Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves*. Am. J. Vet. Res. 59:37-43.
- Lee, J.W.; Bannerman, D.D.; Paape, M.M.; Huang, M. y 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, J.W.; Paape, M.J.; Elsasser, T.H. y Zhao, X. (2003). *Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with Escherichia coli lipopolysaccharide*. J. Dairy Sci. 86:2382-2389.
- Leitner, G.; Eligulashvily, R.; Krifucks, O.; Perl, S. y Saran, A. (2003). *Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with Staphylococcus aureus*. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. 50:45-52.
- Leitner, G.; Shoshani, E.; Krifucks, O.; Chaffer, M. y Saran, A. (2000). *Milk leukocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology*. J. Vet. Med. Ser. B. 47:581-589.
- Leonard, E.; Skeel, J.A.; Yoshimura, T.; Noer, K.; Kutvivi, S. y VanEpps, D. (1990). *Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/ activation protein-1*. J. Immunol. 144:1323-1330.
- Lewis, D.E. y Rickman, W.J. (1992). *Methodology and quality control for flow cytometry*. En: Manual of Clinical Laboratory Immunology, American Society for Microbiology, (Eds.: Rose, N.R.; De Macario, E.C.; Fahey, J.L.; Friedman, H. y Penn, G.M.), Washington, D.C.
- Liu, A.J.; Cui, J.Z. y Wang, B.X. (1982). *Effects root saponin on the immunity*. Ji Lin Med. Sci. 3:56-57.
- Liu, M. y Zhang M.T. (1996). *Studies on the mechanisms of immunoregulatory effects of ginsenoside Rg1 in aged rats*. Yao Xue Xue Bao. 31:95-100.
- Liu, M. y Zhang, J.T. (1995). *Immunoregulatory effects of ginsenoside Rg1 in aged rats*. Yao Xue Xue Bao. 30:818-823.
- MacMicking, J.; Xie, Q.W. y Nathan C. (1997). *Nitric oxide and macrophage function*. Annu. Rev. Immunol. 15:323-350.
- Makkar, P.S. y Becker, K. (1996). *Effect of Quillaja saponins on in vitro rumen fermentation*. Saponins used in Food and Agriculture. (Eds.: Waller, G.R. and Yamasaki, K), Plenum Press New York, p. 387-394.
- Maliszewski, C.D. y Wright, S.D. (1991). *CD14 and immune response to lipopolysaccharide*. Science. 252:1321-1322.

- Manlongat, N.; Yang, T.; Hinckley, L.; Bendel, R. y Krider, H. (1998). *Physiologicchemoattractant- induced migration of polymorphonuclear leukocytes in milk*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5:375-381.
- McDonald, J.S. y Anderson, A.J. (1981). *Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: The early nonlactating period*. Am. J. Vet. Res. 42:1360-1365.
- Medzhitov, R. y Janeway, C.A.Jr. (2000a). *Advances in Immunology: Innate Immunity*. N. Eng. J. Med. 343:338-344.
- Medzhitov, R. y Janeway, C.Jr. (2000b). *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol. Rev. 173:89-97.
- 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.
- Merezhinskaya, N.; Ogunwuyi, S.A.; Mullick, F.G. y Fishbein, W.N. (2004). *Presence and Localization of Three Lactic Acid Transporters (MCT1, -2, and -4) in Separated Human Granulocytes, Lymphocytes, and Monocytes*. J. Histochem. Cytochem. 52:1483-1493.
- Miles, D.; Happerfield, L.; Naylor, M.; Bobrow, L.; Rubens, R. y Balkwill, F. (1994). *Expression of tumor-necrosis-factor (TNF- $\alpha$ ) and its receptor in benign and malignant breast-tissue*. Int. J. Cancer. 56:777-782.
- Miller, R.H.; Paape, M.J. y Fulton, L.A. (1991). *Variation in Milk Somatic Cells of Heifers at First Calving*. J. Dairy Sci. 74:3782-3790.
- Minami, S.; Egawa, T.; Ohira, J.; Okamoto, Y. y Matsuhashi, A. (1997). *Effects of chitosan with intramammary administration on phagocytes in udder secretion*. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 50:143-146.
- Miossec, P.; Cavender, D. y Ziff, M. (1986). *Production of interleukin 1 alpha by human endothelial cells*. J. Immunol. 136:2486-2491.
- Monks, J.; Geske, J.F.; Lehman, L. y Fadok, V.A. (2002). *Do Inflammatory Cells Participate in Mammary Gland Involution?* J. Mammary Gland Biol. 7:163-175.

- Moon, J.S.; Joo, Y.S.; Ku, B.K.J.; Kim, Y.; Park, Y.H. y Hahn, T.W. (1998). *A study on efficacy of chitosan on bovine mastitis*. Korean J. Vet. Res. 38:71-76.
- Morath, S.; Geyer, A. y Hartung T. (2001). *Structure function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus*. J. Exp. Med. 193:393-397.
- Morris, H.Q.; Martínez, C.; Abdala, R.T. y Campos, D.O. (1999). *Adyuvantes Inmunológicos*. Rev. Cubana Invest. Biomed. 18:130-137.
- Mueller, M.; Brandenburg, K.; Dedrick, R.; Schromm, A.B. y Seydel, U. (2005) *Phospholipids inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cell activation: a role for LPS-binding protein*. J. Immunol. 174:1091-1096.
- Mukherjee, R. (2009). *Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk cells in response to Azadirachta indica during bovine mastitis*. Trop. Anim. Health Prod. 41:189-197.
- Murray, R.Z.; Kay, J.G.; Sangermani, D.G. y Stow, J.L. (2005). *A role for the phagosome in cytokine secretion*. Science. 310:1492-1495.
- Murrieta, C.M.; Scholljegerdes, E.J.; Hess, B.W.; Rule, D.C.; Engle, T.E. y Hossner, K.L. (2005). *Evaluation of milk somatic cells as a source of mRNA for study of mammary gland lipogenesis in lactating beef cows*. Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science. 56:36-39.
- Myllys, V. y Honkanen-Buzalski, T. (1994). *Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis*. J. Dairy Sci. 77:446-452.
- Nakajima, Y.; Mikami, O.; Yoshioka, M.; Motoi, Y.; Ito, T.; Ishikawa, Y.; Fuse, M.; Nakano, K. y Yasukawa, K. (1997). *Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis*. Res. Vet. Sci. 62:297-298.
- Nickerson, S.C. (1989). *Immunological aspects of mammary involution*. J. Dairy Sci. 72:1665-1678.
- Nickerson, S.C.; Boddie, R.L.; Owens, W.E. y Watts, J.L. (1990). *Effects of novel intramammary device models on incidence of mastitis after experimental challenge*. J. Dairy Sci. 73:2774-2784.

- Nickerson, S.C.; Owens, W.E. y Watts, J.L. (1989). *Effects of recombinant granulocyte colony stimulating factor on Staphylococcus aureus mastitis in lactating dairy cows*. J. Dairy Sci. 72:3286-3294.
- Nickerson, S.C.; Owens, W.E.; Boddie, R.L. y Boddie, N.T. (1992). *The effect of chronic immunostimulation of the nonlactating bovine mammary gland with interleukin-2, pokeweed mitogen, and lipopolysaccharide*. J. Dairy Sci. 75:3339-3351.
- Nickerson, S.C.; Owens, W.E.; Rejman, J.J. y Oliver, S.P. (1993). *Effects of interleukins-1 and interleukines-2 on mammary gland leukocyte populations and histology during the early nonlactating period*. Zentral bl. Veterinarmed B. 40:621-633.
- Nicola, N.A. (1994). En: *Guidebook to cytokines and their receptors*. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 1-7.
- NMC, National Mastitis Council. (1996). *Current concept of bovine mastitis*. 4<sup>th</sup> edition.
- Nordin, W. y Lee, C.S. (1982). *Cytology of milk in guinea pigs*. Acta Anat. 113:135-144.
- Norman, G. y Streiner, D. (1996). *Bioestadística*. Editorial Harcourt Brace, Barcelona, España.
- O' Brien, B.; Fitzpatrick, C.; Meaney, W.J. y Joyce, P. (1999). *Relationship between somatic cell count and neutrophils in milk*. Irish J. Agric. Food Res. 38:288-296.
- Ohtsuka, H.; Kudo, K.; Mori, K.; Nagai, F.; Hatsugaya, A. y Tajima, M. (2001). *Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis*. J. Vet. Med. Sci. 63:675-678.
- Okada, N.; Kobayashi, M.; Mugikura, K.; Okamatsu, Y.; Hanazawa, S.; Kitano, S. y 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, S.P. y Sordillo, L.M. (1989). *Approaches to the manipulation of mammary involution*. J. Dairy Sci. 72:1647-1664.

- Ollivier-Bousquet, M. (1998). *Transferrin and prolactin transcytosis in the lactating mammary epithelial cell*. J. Mammary Gland Biol. 3:303-313.
- Onoda, M. e Inano, H. (1998). *Localization of nitric oxide synthases and nitric oxide production in the rat mammary gland*. J. Histochem. Cytochem. 46:1269-1278.
- Oppenheim, J.J.; Zachariae, O.C.; Mukaida, N. y Matsushima, K. (1991). *Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family*. Annu. Rev. Immunol. 9:617-618.
- Orsi, N. (2004). *The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives*. Biometals. 17:189-196.
- Östensson, K.; Hageltorn, M. y Aström, G. (1988). *Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows*. Acta Vet. Scand. 29:493-500.
- Oviedo-Boyso, J.; Valdez-Alarcón, J.J.; Cajero-Juárez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E.; Bravo-Patiño, A. y Baizabal-Aguirre, V.M. (2007). *Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis*. J. Infec. 54:399-409.
- Paape, M.; Lilius, E.; Wiitanen, P.; Kontio, M. y Miller, R.H. (1996). *Intramammary defense against infectious induced by Escherichia coli in cows*. Am. J. Vet. Res. 57:477-482.
- Paape, M.J.; Guidry, A.J.; Jain, N.C. y Miller, R.H. (1991). *Leukocytic defense mechanisms in the udder*. Flem. Vet. J. 62:95-109.
- Paape, M.J.; Shafer-Weaver, K.; Capuco, A.V.; Van Oostveldt, K. y Burvenich, C. (2000). *Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells*. Adv. Exp. Med. Biol. 480:259-277.
- Paape, M.J.; Wergin, W.P. y Guidry, A.J. (1981). *Phagocytic defense of the ruminant mammary gland*. Adv. Exp. Med. Biol. 137:555-578.
- Pareek, R.; Wellnitz, O.; Van Dorp, R.; Burton, J. y Kerr, D. (2005). *Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells*. J. Appl. Genet. 46:171-177.
- Pell, J.M. (1995). *Principles of immunomodulation*. Livest. Prod. Sci. 42:122-133.

- Persson Waller, K.; Colditz, I.G.; Lun, S. y Östensson, K. (2003). *Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis*. Res. Vet. Sci. 74:31-36.
- Persson, K.; Colditz, I.G.; Flapper, P.; Franklin, N.A.F. y Seow, H.F. (1996). *Cytokine-induced inflammation in the ovine teat and udder*. Vet. Immunol. Immunopathol. 53:73-85.
- Pillai, N.R. y Santhakumari, G. (1981). *Antiarthritic and antiinflammatory action of nimbidin*. Planta Medica. 43:59-63.
- Politis, I.; McBride, B.W.; Burton, J.H.; Zhao, X. y Turner J.D. (1991). *Secretion of interleukin-1 by bovine milk macrophages*. Am. J. Vet. Res. 52:858-862.
- Politis, I.; Zhao, X.; McBride, B.W. y Burton, J.H. (1992). *Function of bovine mammary macrophages as antigenpresenting cells*. Vet. Immunol. Immunopathol. 30:399- 410.
- Poutrel, B.; Caffin, J.P. y Rainard, P. (1983). *Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk*. J. Dairy. Sci. 66:535-541.
- Quinn, P.J. (1990). *Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine*. Adv. Vet. Sci. Com. Med. 35:43-99.
- Quiroga, G.H. y Nickerson, S.C. (1993). *Histologic response of the Heifer mammary gland to intrammary infusion of interleukin-2 or interferon- $\gamma$* . J. Dairy Sci. 76:2913-2924.
- Rainard, P. (1993). *Activation of the classical pathway of complement by binding of bovine lactoferrin to unencapsulated Streptococcus agalactiae*. Immunology. 79: 648-652.
- Rainard, P. y Riollet, C. (2003). *Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland*. Reprod. Nutr. Dev. 43:439-57.
- Rainard, P. y Riollet, C. (2006). *Innate immunity of the bovine mammary gland*. Vet. Res. 37:369-400.
- Rainard, P.; Fromageau, A.; Cunha, P. y Gilbert, F.B. (2008). *Staphylococcus aureus lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland*. Vet. Res. 39:52

- Rainard, P.; Poutrel, B. y Caffin, J.P. (1982). *Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological factors*. Ann. Rech. Vet. 13:321-328.
- Rambeaud, M.; Almeida, R.A.; Pighetti, G.M. y Oliver, S.P. (2003). *Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced Streptococcus uberis mastitis*. Vet. Immunol. Immunopathol. 96:193-205.
- Reiter, B. (1985). *Protective proteins in milk – Biological significance and exploitation. Lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase, xanthineoxidase*. Bull. Int. Dairy Fed. 191:1-35.
- Rejman, J.J.; Turner, J.D. y Oliver, S.P. (1993). *Influence of recombinant bovine cytokines on proliferation of a bovine mammary epithelial cell line*. Cell Biol. Int. 17:619-621.
- Rewinski, M.J. y Yang, T.J. (1994). *Lactation stage-dependent changes in levels of tumor necrosis factor (TNF)/cachectin in milk*. Am. J. Reprod. Immunol. 31:170-176.
- Riedy, M.C. (1997). *Characterization of murine macrophages*. En: Current Protocols in Immunology, (Eds.: Coligan, J.E.; Kruisbeek, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M. y Strober, W), Wiley & Sons, New York.
- Riollet, C.; Rainard, P. y Poutrel, B. (2000). *Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland*. Adv. Exp. Med. Biol. 480:247-258.
- Riollet, C.; Rainard, P. y Poutrel, B. (2001). *Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic Staphylococcus aureus infection*. J. Dairy Sci. 84:1077-1084.
- Rivera, E.; Hu, S. y Concha, C. (2003). *Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvants*. Vaccine. 21:1149-1157.
- Rosenberger, C.M. y Finlay, B.B. (2003). *Phagocyte sabotage: disruption of macrophages signalling by bacterial pathogens*. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 4:385-396.



- Sample, A.K. y Czuprynski, C.J. (1991). *Priming and stimulation of bovine neutrophils by recombinant human interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha*. J. Leukoc. Biol. 49:107-115.
- Sanchez, L.; Aranda P.; Perez, M.D. y Calvo, M. (1988). *Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk*. Biol. Chem. Hoppe Seyler 369:1005-1008.
- Sandholm, M. y Korhonen, H. (1995). *Infection of the udder – Udder inflammation*. En: The bovine udder and mastitis. (Eds.: M. Sandholm, T. Honkanen – Buzalski, L.Kaartinen, S. Pjorala) p. 37-48.
- Saran, A. y Chaffer, M. (2000). *Mastitis y calidad de la leche*. Ed. Inter-Médica. Buenos Aires, p. 14-16, 31-42.
- Sawaf, M.H.; Ouhayoun, J.P. y Forest, N. (1991). *Cytokeratin profiles in oral epithelia: a review and a new classification*. J. Biol. Buccale. 19:187-198.
- Scaglione, F.; Cogo, R.; Cocuzza, C.; Arcidiacono, M. y Beretta, A. (1994). *Immunomodulatory effects of Panax ginseng C.A. Meyer (G115) on alveolar macrophages from patients suffering with chronic bronchitis*. Int. J. Immunotherapy. 10:21-24.
- Scaglione, F.; Ferrara, F.; Dugnani, S.; Falchi, M.; Santoro, G. y Frascini, F. (1990). *Immunomodulatory effects of two extracts of Panax ginseng C.A. Meyer*. Drugs Exp. Clin. Res. 16:537-542.
- Schroder, J.M.; Morwietz, U.; Morita, E y Christophers, E. (1987). *Purification and partial biochemical characterization of a human monocytederived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin-1 activity*. J. Immunol. 139:3474-3483.
- Selsted, M.E.; Tang, Y.Q.; Morris, W.L.; McGuire, P.A.; Nonotny, M.J.; Smith, W.; Henschen, A.H. y Cullor H.S. (1993). *Purification, primary structures, and antibacterial activities of the beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils*. J. Biol. Chem. 268:6641-6648.
- Seo, H.; Mitsuhashi, K. y Tanibe, H. (1992). *Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan*. En: Advances in chitin and chitosan. (Eds.: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP), Elsevier, London, p 34-40.

- Shafer-Weaver, K. y Sordillo, L.M. (1996). *Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period*. J. Dairy Sci. 79:1347-1352.
- Shin, J.Y.; Song, J.Y.; Yun, Y.S.; Yang, H.O.; Rhee, D.K. y Pyo, S. (2002). *Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of Panax ginseng on macrophage function*. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 24:469-482.
- Shuster, D.E.; Kehrli, M.E. y Stevens, M.G. (1993). *Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows*. Am. J. Vet. Res. 54:80-87.
- Shuster, D.E.; Kehrli, M.E.; Rainard, P. y Paape, M. (1997). *Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with Escherichia coli*. Infect. Immun. 65:3286-3292.
- Shuster, D.E.; Lee, E.K.; y Kehrli, M.E. (1996). *Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at mid-lactation*. Am. J. Vet. Res. 57:1569-1575.
- Slebodzinski, A.B.; Malinowski, E. y Lipczak, W. (2002). *Concentrations of triiodothyronine (T3), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in milk from healthy and naturally infected quarters of cows*. Res. Vet. Sci. 72:17-21.
- Smith, K.L. y Oliver, S. P. (1981). *Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland*. Adv. Exp. Med. Biol. 137:535-554.
- Sohn, E.J.; Paape, M.J.; Peters, R.R.; Fetterer, R.H.; Talbot, N.C. y Bannerman, D.D. (2004). *The production and characterization of anti-bovine CD14 monoclonal antibodies*. Vet. Res. 35:597-608.
- Solomon, K.A.; Pesti, N.; Wu, G. y Newton, R.C. (1999). *Cutting edge: a dominant negative form of TNF- $\alpha$  converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion*. J. Immunol. 63:4105-4108.
- Song, Z.K.; Johansen, H.; Faber, V. y Hoiby, N. (1997). *Ginseng treatment enhances bacterial clearance and decreases lung pathology in athymic rats with chronic Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. APMIS. 105:438-444.

- Sonoda, Y.; Kasahara, T.; Mukaida, N.; Shimizu, N.; Tomoda, M. y Takeda, T. (1998). *Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of Panax ginseng*. Immunopharmacol. 38:287-294.
- Sordillo, L.M. (1993). *Increasing udder immunity with cytokines*. In: N.M.C. Regional Meeting Proc, p. 56-63.
- Sordillo, L.M. y Babiuk, L.A. (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, L.M. y Streicher, K.L. (2002). *Mammary gland immunity and mastitis susceptibility*. J. Mammary Gland Biol. 7:135-146.
- Sordillo, L.M.; Nickerson, S.C. y Akers R.M. (1989). *Pathology of Staphylococcus aureus mastitis during lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function*. J. Dairy Sci. 72:228-244.
- Sordillo, L.M.; Nickerson, S.C.; Akers, R.M. y Oliver, S.P. (1987). *Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis*. Int. J. Biochem. 19:1165-1172.
- Sordillo, L.M.; Shafer-Weaver, K. y DeRosa, D. (1997). *Symposium: bovine immunology. Immunobiology of the mammary gland*. J. Dairy Sci. 80:1851-1865.
- Spiegel, M.R. (1991). Probabilidad y estadística. Editorial McGraw Hill, Buenos Aires.
- Srivastava, M.D.; Srivastava, A.; Brouhard, B.; Saneto, R.; Groh-Wargo, S. y Kubit, J. (1996). *Cytokines in human milk*. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 93:263-287.
- Steinert, P.M. y Roop, D.R. (1988). *Molecular and cellular biology of intermediate filaments*. Ann. Rev. Biochem. 57:593-625.
- Stites, D.P.; Stogo, J.D.; Fuderberg, U.H. y Wule, V.J. (1985). *Inmunología Básica y Clínica*. Editorial Científico Técnica, Ciudad de La Habana, p. 200-250.
- Stolzenberg, E.D.; Anderson, G.M.; Ackermann, M.R.; Whitlock, R.H. y Zasloff, M. (1997). *Epithelial antibiotic induced in states of disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:8686-8690.

- Strandberg, Y.; Gray, C.; Vuocolo, T.; Donaldson, L.; Broadway, M. y Tellam, R. (2005). *Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells*. Cytokine. 31:72-86.
- Sudarshan, N.R.; Hoove, D.G. y Knorr, D. (1992). *Antibacterial action of chitosan*. Food Biotechnol. 6:257-272.
- Suttles, J.; Milhorn, D.M.; Miller, R.W.; Poe, J.C.; Wahl, L.M. y Stout, R.D. (1999). *CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin IL-4 and IL-10 antiinflammatory action*. J. Biol. Chem. 274:5835-5842.
- Takahashi, H.; Komatsu, T.; Hodate, K.; Horino, R. y Yokomizo, Y. (2004). *Effect of intramammary injection of RbIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and Staphylococcus aureus in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis*. J. Vet. Med. B. 52:32-37.
- Takx-Köhlen, B.C. (1992). *Immunomodulators. Future prospects*. Pharm. Weekbl Sci. 14:245-252.
- Tan, B.K. y Vanitha, J. (2004). *Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: a review*. Curr. Med. Chem. 11:1423-1430.
- Tatarczuch, L.; Philip, C. y Lee, C.S. (2000). *Leucocyte phenotypes in involuting and fully involuted mammary glandular tissues and secretions of sheep*. J. Anat. 196:313-326.
- Tizard, I. (1996). *Veterinary Immunology: an introduction*. 5<sup>th</sup> Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, p. 531.
- Tizard, I.R. (2000). *Veterinary Immunology: an introduction*. Ed. B. Saunders Company; Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos, p. 375-377.
- Tracey, K.J. (1994). *Tumor necrosis factor-alpha*. En: The cytokine handbook, Ed. 2<sup>a</sup>, San Diego C.A., Academic Press, p. 289-300.
- Treece, J.M.; Morse, G.E. y Levy, C. (1966). *Lipid analyses of bovine teat canal keratin*. J. Dairy Sci. 49:1240.

- Trinchieri, G. (1995). *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity*. *Ann. Rev. Immunol.* 13:251-276.
- Tzianabos, A.O. (2000). *Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function*. *Clin Microbiol Rev.* 13:523-533.
- Upadhyay, S.N.; Dhawan, S.; Garg, S. y Talwar, G.P. (1992). *Immunomodulatory effects of neem (Azadirachta indica) oil*. *Int. J. Immunopharm.* 14:1187-1193.
- van Crevel, R.; Ottenhoff, T.H. y van der Meer, J.W. (2002). *Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:294-309.
- van der Poll, T. y van Deventer, S.J. (1998). *The role of interleukin 6 in endotoxin-induced inflammatory responses*. *Prog. Clin. Biol. Res.* 397:365-377.
- Vandeputte-Van Messom, G.; Burvenich, C.; Roets, E.; Massart-Leen, A.M.; Heyneman, R.; Kremer, W.D.J. y Brand, A. (1993). *Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced Escherichia coli mastitis*. *J. Dairy Res.* 60:19-29.
- Verhoef, J. (1991). *Modulation of inflammation*. *Flem. Vet. J.* 62:153-161.
- Wang, A.; Wang, C.Z.; Wu, J.A.; Osinski, J. y Yuan, C.S. (2005). *Determination of major ginsenosides in Panax quinquefolius (American ginseng) using high-performance liquid chromatography*. *Phytochem. Anal.* 16:272-277.
- Wang, M.Z.; Gao, F.Y.; Zhang, G.D. y Zhang, S.R. (1979). *Analysis of ginseng*. *Acta Pharmacol. Sin.* 14:309-315.
- Wang, Y.; Zarlenga, D.S.; Paape, M.J. y Dahl, G.E. (2002). *Recombinant bovine soluble CD14 sensitizes the mammary gland to lipopolysaccharide*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86:115-124.
- Wedlock, D.N.; Doolin, E.E.; Parlane, N.; Lacy-Hulbert, S. y Woolford, M.W. (2000). *Effects of yeast expressed recombinant interleukin- 2 and interferon-c on physiological changes in bovine mammary glands and on bactericidal activity of neutrophils*. *J. Dairy Res.* 67:189-197.
- Williamson, E.M. (2002). *Major herbs of Ayurveda*. Dabur Research Foundation and Dabur Ayurved Ltd. Churchill Livingstone. London, p. 53-63.

- Wolf, J.S.; Chen, Z. y Dong, G. (2001). *IL (Interleukin)-1 promotes nuclear factor- $\kappa$ B and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas*. Clin. Cancer Res. 7:1812-1820.
- Wolter, W. y Kloppert, B. (2004). *Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina*. Guadalajara, Jalisco, México, p. 5.
- Woods, A. y Ellis, C.R. (1994). *Laboratory Histopathology. A Complete Reference*. Longman Group Limited. London. 4.1-1 - 4.6-6.
- Wright, S.D.; Ramos, R.A.; Tobias, P.S.; Ulevitch, R.J. y Mathison, J.C. (1990). *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science. 249:1431-1433.
- Wu, S.; Hua, Z.J.; Xiao, Y.L. y Wang, Y. (1991). *Effect of Ginsenopolypeptide on the 3H-TdR integration of humen blood lymphocyte*. Chin. Med. J. 104:399-401.
- Yamanaka, H.; Hisaeda, K.; Hagiwara, K.; Kirisawa, R. y 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, G.S. y Yu, Y.L. (1990). *Immunopotentiating effect of traditional Chinese drugs-ginsenoside and glycyrrhiza polysaccharide*. Proc. Chin. Acad. Med. Sci. Peking Union. Med. Coll. 5:188-193.
- Yount, N.Y.; Yuan, J.; Tarver, A.; Castro, T.; Diamond, G.; Tran, P.A.; Levy, J.N.; McCullough, C.; Cullor, J.S.; Bevins, C.L. y Selsted, M.E. (1999). *Cloning and expression of bovine neutrophil beta-defensins. Biosynthetic profile during neutrophilic maturation and localization of mature peptide to novel cytoplasmic dense granules*. J. Biol. Chem. 274:26249-26258.
- Zecconi, A.; Bronzo, V.; Casula, A.; Luzzago, C.; Moroni, P.; Piccinini, R. y Spreafico, G. (1999). *Efficacy of a biological response modifier in preventing Staphylococcus aureus intramammary infections after calving*. J. Dairy Sci. 82:2101-2107.
- Zecconi, A.; Hamann, J.; Bronzo, V.; Moroni, P.; Giovannini, G. y Piccinini, R. (2000) *Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections*. Adv. Exp. Med. Biol. 480:287-293.

- Zhang, H. y Issekutz, A.C. (2002). *Down-regulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor*. Am. J. Pathol. 160:2219-2230.
- Zhen, Y.H.; Jin, L.J.; Li, X.Y.; Guo, J.; Li, Z; Zhang, B.J.; Fang, R. y Xu, Y.P. (2009). *Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus*. Vet. Microbiol. 133:317-322.
- Zhou, Y.; Lin, G.; Baarsch, M.J.; Scamurra, R.W. y Murtaugh, M.P. (1994). *Interleukin-4 suppresses inflammatory cytokine gene transcription in porcine macrophages*. J. Leukoc. Biol. 56:507-513.
- Zhu, S.; Zou, K.; Fushimi, H.; Cal, S. y Komatsu, K. (2004). *Comparative study on triterpene saponins of Ginseng drugs*. Planta Med. 70:666-677.

**Páginas de internet:**

- Gilson, W. (1995). *Interpreting and using mastitis screening test*. University of Georgia. College of Agricultural & Environmental Sciences. Bulletin 913  
Disponible en: <http://www.ces.uga.edu/pubcd/b913-w.htm>
- <http://www.marianosastre.com/wp/wp-content/uploads/2009/ginseng.jpg>
- <http://www.servet.es/posteres.php?pg=pt>
- Hurley, W. L. (1999). *Mammary Gland Involution and the Dry Period*. En: Lactation Biology course. Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana-Champaign. <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/involution.html>.





## PREPARACIÓN BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN IHQ

### Solución fijadora de formol bufferado 10%:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,00 g	(o Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O)	10,08 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,00 g	(o NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	6,50 g
Formol	100 ml		
Agua destilada	900 ml		

### Buffer Fosfato Salino (PBS) 0,01M, pH 7,2

#### Solución stock (PBS 10X):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,4 g
(o Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O)	28,75 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,3 g
(o NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,54 g
Agua destilada	1.000 ml

#### Solución de trabajo (PBS 1X):

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

#### Observación:

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

### Buffer Citrato 0,01M, pH 6,00

#### Solución stock:

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

#### Solución de trabajo:

Solución Stock	1 volumen
Completar con agua destilada hasta	500 ml
Controlar pH	

### **Solución de Bloqueo para IHQ (Suero Normal de Cabra al 10%)**

#### *Solución de trabajo:*

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

### **PBS-BSA para dilución de anticuerpos**

#### *Solución de trabajo:*

Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2	100 ml
Albúmina Sérica Bovina	1 g
Azida Sódica	0,1 g

### **PREPARACIÓN BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN WB**

#### **Buffer de Lysis RIPA (RadioInmunoPrecipitation Assay)**

1% IGEPAL CA630	10 ml
0.5% Desoxicolato de Sodio	5 g
0.1% SDS	1 g
1 mM EDTA	0.3722 g
50 mM Fluoruro de Sodio	2.0995 g
0.1 M PBS Csp	1000 ml

#### **Solución Acrilamida/Bis-acrilamida (30%T, 2.7%C)**

Acrilamida	29.2 g
N'N'-bis-metilen-acrilamida	0.8g
Agua bidestilada	100 ml
Resina de intercambio iónico (conservante)	1 cucharada

#### **Buffer gel acrilamida/Bis-acrilamida 1.5M Tris-HCl, pH 8.8**

Tris Base	18.15 g
Completar con agua destilada hasta	100 ml

#### **Buffer gel acrilamida/Bis-acrilamida 0.5M Tris-HCl, pH 6.8**

Tris Base	6 g
-----------	-----

Completar con agua destilada hasta	100 ml
------------------------------------	--------

**Persulfato de Amonio (APS) 10%**

APS	100 mg
Agua destilada	1 ml

**Buffer de corrida Tris-Glicina, pH 8,3**

*Solución stock 4X:*

Tris Base (25 mM)	6.06 g
Glicina (192mM)	28.80 g
Agua bidestilada	500 ml

*Solución de trabajo 1X, 0.1 % de SDS:*

Buffer 4X	250 ml
SDS	1g

**Buffer de Transferencia pH 8.3 (Towbin transfer buffer)**

Buffer de corrida 4X	250 ml
Metanol	200 ml
Agua bidestilada	550 ml

**Rojo Ponceau (0.2% en ácido acético 0.5% en agua destilada)**

Rojo Ponceau S	0.1 g
Ácido acético	0.25 ml
Agua bidestilada	49.75 ml

**Coomasie Brilliant Blue Solución del colorante stock**

Solución de Coomasie Brilliant Blue R-250 al 1% en agua desionizada.  
Solución de Uso (Coomasie 0.125%. Metanol 50%, Ácido acético 10%):

Coomasie Brilliant Blue R-250 1%	12.5 ml
Metanol	50.0 ml
Ácido acético	10.0 ml
Agua desionizada Csp	100.0 ml

**Solución Decolorante 1**

Metanol 40%	200 ml
Ácido acético 10%	50 ml
Agua desionizada	250 ml

### **Solución Decolorante 2**

Metanol 5%	25 ml
Ácido acético 7%	35 ml
Agua desionizada Csp	500 ml

### **TBS 1X**

NaCl	8.065 g
KCl	0.2 g
Tris Base	2.422 g
Agua Desionizada c.s.p.	1000 ml

### **TBS 10X**

NaCl (1.38M)	40.32 g
KCl (27mM)	1 g
Tris Base (200mM)	12.11 g
Agua Desionizada c.s.p.	500 ml

### **TBS-Tween**

TBS	1000 ml
Tween 20	0.5 ml

### **Reactivo Quimioluminiscente Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE.)**

Solución A	1 ml
Solución B	25 µl

### **Solución Reveladora**

Revelador (Kodak)	50 ml
Agua destilada	50 ml

### **Solución Fijadora**

Fijador y Fortalecedor (Kodak)	25 ml
Agua destilada	90 ml

## **PREPARACIÓN BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN RT-PCR**

### **Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2 estéril**

#### *Solución stock (PBS 10X):*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,4 g
(o Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O)	28,75 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,3 g
(o NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,54 g
Agua DEPC (0,1%)	1.000 ml

#### *Solución de trabajo (PBS 1X):*

NaCl	8 g
Solución Stock	100 ml
Completar con agua DEPC (0,1%) hasta	1.000 ml

### **Agua DEPC 0,1%**

DEPC (Diethylpyrocarbonate)	1 ml
Completar con Agua bidestilada estéril	1000 ml

### **Buffer de dilución de primers TE (10mM Tris-HCL, pH 8, 1 mM EDTA)**

Tris- HCl (1 M)	1 ml
EDTA (0,5 M)	0,2 ml
Agua destilada	98,8 ml

### **Buffer TAE 50X**

#### *Solución Stock:*

Tris base	121g
Ácido acético glacial	28.55 ml
EDTA 0.5M pH 8	50.00 ml
Agua destilada estéril	21.45 ml

#### *Solución de trabajo (TAE 1X):*

TAE 50X (Stock)	10 ml
-----------------	-------

Agua destilada	490 ml
----------------	--------

**Buffer de Carga FA 10X (Formaldehyde gel-Loading Buffer)**

Glicerol 87% en agua DEPC	57.47 ml
EDTA 0.5mM	2 ml
0.25 % de xylencyanol FF	250 mg
0.25 %Azul de bromofenol	250 mg

**Gel de agarosa 2%**

Agarosa Ultra Pure	1.2 g
Agua destilada	58.8 ml
Buffer TAE 50X	1.2 ml

**PREPARACIÓN BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN CITOMETRÍA DE FLUJO**

**Buffer de lavado**

EDTA	0.5 mM.
ASB	1 g
Azida sódica	0,01 g
PBS	100 ml.


**Solución de permeabilización**

Saponina	0,1 g.
Solución de lavado	100 ml.



## Resultados BLASTn secuencias citoquinas y gen normalizador ( $\beta$ -actina)

- Resultados de Blast para amplificadores de  $\beta$ -actina en glándula mamaria bovina

[gb|BC142413.1](#)  Bos taurus actin, beta, mRNA (cDNA clone MGC:159611 IMAGE:8448844), complete cds  
Length=1845

[GENE ID: 280979 ACTB](#) | actin, beta [Bos taurus] (Over 10 PubMed links)

Score = 440 bits (238), Expect = 2e-120  
Identities = 238/238 (100%), Gaps = 0/238 (0%)  
Strand=Plus/Plus



```
Query 1      GTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACGGACTACCTCATGAAGATCCTCACGGAGCGTG 60
              |||
Sbjct  618     GTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACGGACTACCTCATGAAGATCCTCACGGAGCGTG 677

Query  61      GCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAGCGGGAAATCGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTCT 120
              |||
Sbjct  678     GCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAGCGGGAAATCGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTCT 737

Query  121     GCTACGTGGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGGCCTCCAGCTCCTCCCTGG 180
              |||
Sbjct  738     GCTACGTGGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGGCCTCCAGCTCCTCCCTGG 797

Query  181     AGAAGAGCTACGAGCTTCCTGACGGGCAGGTCATCACCATCGGCAATGAGCGGTTCCG 238
              |||
Sbjct  798     AGAAGAGCTACGAGCTTCCTGACGGGCAGGTCATCACCATCGGCAATGAGCGGTTCCG 855
```

- Resultados de Blast para amplificadores de IL-1 $\alpha$  en glándula mamaria bovina

[ref|NM\\_174092.1](#)  Bos taurus interleukin 1, alpha (IL1A), mRNA  
[gb|M37210.1|BOVIL1A](#)  Bovine interleukin 1-alpha (IL-1-alpha) mRNA, complete cds  
Length=2017

[GENE ID: 281250 IL1A](#) | interleukin 1, alpha [Bos taurus]  
(10 or fewer PubMed links)

Score = 540 bits (292), Expect = 2e-150  
Identities = 292/292 (100%), Gaps = 0/292 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 2      TGCAAGCTATGAGCCACTTCGTGAGGACCAGATGAATAAGTTTATGTCCCTGGATACCTC 61
              |||
Sbjct  166     TGCAAGCTATGAGCCACTTCGTGAGGACCAGATGAATAAGTTTATGTCCCTGGATACCTC 225

Query  62      GGAAACCTCTAAGACATCCAAGCTTAGCTTCAAGGAGAATGTGGTGATGGTGGCAGCCAG 121
              |||
Sbjct  226     GGAAACCTCTAAGACATCCAAGCTTAGCTTCAAGGAGAATGTGGTGATGGTGGCAGCCAG 285

Query  122     TGGGAAGATTCTGAAGAAGAGACGGTTGAGTTTAAATCAGTTCATCACCGATGATGACCT 181
              |||
```




```

Sbjct  286  TGGGAAGATTCTGAAGAAGAGACGGTTGAGTTTAAATCAGTTCATCACCGATGATGACCT  345
Query  182  GGAAGCCATTGCCAATAATACAGAAGAAGAAATCATCAAGCCCAGATCAGCACATTACAG  241
      |||
Sbjct  346  GGAAGCCATTGCCAATAATACAGAAGAAGAAATCATCAAGCCCAGATCAGCACATTACAG  405
Query  242  CTTCCAGAGTAACGTGAAATACAACCTTTATGAGAGTCATCCACCAGGAATGC  293
      |||
Sbjct  406  CTTCCAGAGTAACGTGAAATACAACCTTTATGAGAGTCATCCACCAGGAATGC  457

```

- Resultados de Blast para amplificadores de IL-1β en glándula mamaria bovina

[gb|EU276067.1|](#)  Bos taurus interleukin 1 beta (IL1b) mRNA, complete cds  
Length=847

[GENE ID: 281251 IL1B](#) | interleukin 1, beta [Bos taurus] (Over 10 PubMed links)


Score = 307 bits (166), Expect = 1e-80  
Identities = 166/166 (100%), Gaps = 0/166 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query  1    TGTCGGTCATCGTGGCCATGGAGAAGCTGAGGAACAGTGCCTACGCACATGTCTTCCATG  60
      |||
Sbjct  222    TGTCGGTCATCGTGGCCATGGAGAAGCTGAGGAACAGTGCCTACGCACATGTCTTCCATG  281
Query  61    ATGATGACCTGAGGAGCATCCTTTCATTTCATCTTTGAAGAAGAGCCTGTCTATCTTCGAAA  120
      |||
Sbjct  282    ATGATGACCTGAGGAGCATCCTTTCATTTCATCTTTGAAGAAGAGCCTGTCTATCTTCGAAA  341
Query  121   CGTCCTCCGACGAGTTTCTGTGTGACGCACCCGTGCAGTCAATAAA  166
      |||
Sbjct  342   CGTCCTCCGACGAGTTTCTGTGTGACGCACCCGTGCAGTCAATAAA  387

```

- Resultados de Blast para amplificadores de IL-2 en ganglio linfático bovino

[gb|EU276068.1|](#)  Bos taurus interleukin 2 (IL2) mRNA, complete cds  
Length=491

[GENE ID: 280822 IL2](#) | interleukin 2 [Bos taurus] (10 or fewer PubMed links)

Score = 464 bits (251), Expect = 1e-127  
Identities = 256/258 (99%), Gaps = 1/258 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query  75    CGGT-CATCTACTTCAAGCTCTACGGGGAACACAATGAAAGAAGTGAAGTCATTGCTGCT  133
      |||
Sbjct  64    CGGTGCACCTACTTCAAGCTCTACGGGGAACACAATGAAAGAAGTGAAGTCATTGCTGCT  123
Query  134   GGATTTACAGTTGCTTTTGGAGAAAAGTTAAAAATCCTGAGAACCCTCAAGCTCTCCAGGAT  193
      |||
Sbjct  124   GGATTTACAGTTGCTTTTGGAGAAAAGTTAAAAATCCTGAGAACCCTCAAGCTCTCCAGGAT  183
Query  194   GCATACATTTGACTTTTACGTGCCCAAGGTTAACGCTACAGAATTGAAACATCTTAAGTG  253
      |||
Sbjct  184   GCATACATTTGACTTTTACGTGCCCAAGGTTAACGCTACAGAATTGAAACATCTTAAGTG  243

```


```

Query 254 TTTACTAGAAGAACTCAAACCTTCTAGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCCAAGCAAAAACCT 313
          |||
Sbjct 244 TTTACTAGAAGAACTCAAACCTTCTAGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCCAAGCAAAAACCT 303

Query 314 GAACCCAGAGAGATCAA 331
          |||
Sbjct 304 GAACCCAGAGAGATCAA 321

```

- Resultados de Blast para amplificadores de IL-4 en ganglio linfático bovino

[gb|EU276069.1|](#)  Bos taurus interleukin 4 (IL4) mRNA, complete cds  
Length=451

[GENE ID: 280824 IL4](#) | interleukin 4 [Bos taurus] (10 or fewer PubMed links)

Score = 219 bits (118), Expect = 5e-54  
Identities = 131/137 (96%), Gaps = 2/137 (1%)  
Strand=Plus/Plus

```


Query 22  CAACTGAGAAGGCCACCTTCTGCAGGATTGGAATTGAACTTAGGCGTATCTACAGGAGCC 81
          |||
Sbjct 224  CAACTGAGAAGGAAACCTTCTGCAGGGTTGGAATTGAGCTTAGGCGTATCTACAGGAGCC 283

Query 82  ACACGTGCTTGAACAAATTCCTGGGCGGACTTGACATGGAATCTCAACATGCTTGGCAAG 141
          |||
Sbjct 284  ACACGTGCTTGAACAAATTCCTGGGCGGACTTGACA-GGAATCTCAACA-GCTTGGCAAG 341

Query 142 CAAGACCTGTTCTGTGA 158
          |||
Sbjct 342 CAAGACCTGTTCTGTGA 358

```

- Resultados de Blast para amplificadores de IL-6 en ganglio linfático bovino

[gb|EU276071.1|](#)  Bos taurus interleukin 6 (IL6) mRNA, complete cds  
Length=641

[GENE ID: 280826 IL6](#) | interleukin 6 (interferon, beta 2) [Bos taurus]  
(10 or fewer PubMed links)

Score = 316 bits (171), Expect = 3e-83  
Identities = 173/174 (99%), Gaps = 0/174 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```


Query 78  AGTTTGAAAGCAGCAAGGAGACACTGGCAGAAAATAAGCTGAATCTTCCAAAAATGGAGG 137
          |||
Sbjct 235  AGTGTGAAAGCAGCAAGGAGACACTGGCAGAAAATAAGCTGAATCTTCCAAAAATGGAGG 294

Query 138 AAAAGGACGGATGCTTCCAATCTGGGTTCAATCAGGCGATTTGCTTGATCAGAACCACTG 197
          |||
Sbjct 295  AAAAGGACGGATGCTTCCAATCTGGGTTCAATCAGGCGATTTGCTTGATCAGAACCACTG 354

Query 198 CTGGTCTTCTGGAGTATCAGATATACTGGACTACCTCCAGAACGAGTATGAGG 251
          |||
Sbjct 355  CTGGTCTTCTGGAGTATCAGATATACTGGACTACCTCCAGAACGAGTATGAGG 408

```

- Resultados de Blast INF- $\gamma$  en ganglio linfático bovino

[gb|FJ263670.1|](#)  Bos taurus interferon gamma mRNA, complete cds  
Length=501

[GENE ID: 281237 IFNG](#) | interferon, gamma [Bos taurus] (Over 10 PubMed links)

Score = 272 bits (147), Expect = 4e-70  
Identities = 156/160 (98%), Gaps = 1/160 (0%)  
Strand=Plus/Plus


```

Query 1      CCAGATGTAGCTAAGGGTGGGCCTCTCTCTCAGAAATTTGAAGAATTGGAAAGAAGAA 60
             |||
Sbjct 127    CCAGATGTAGCTAAGGGTGGGCCTCTCTCTCAGAAATTTGAAGAATTGGAAAGATGAA 186

Query 61     AGTGACaaaaaaaaTTATTCAGAGCCAAATTGTCTCCTTATACTTCAAACCTTTGAAAAC 120
             |||
Sbjct 187    AGTGACAAAAAATTATTCAGAGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTCAAACCTTTGAAAAC 246

Query 121    CTCAAAGATAACCAGGTCATTTCAGAAGGAGCATGGATATC 160
             |||
Sbjct 247    CTCAAAGATAACCAGGTCATTCA-AAGGAGCATGGATATC 285
  
```

- Resultados de Blast para amplificadores de IL-8 en glándula mamaria bovina

[gb|EU276073.1|](#)  Bos taurus interleukin 8 (IL8) mRNA, complete cds  
Length=350

[GENE ID: 280828 IL8](#) | interleukin 8 [Bos taurus] (Over 10 PubMed links)

Score = 383 bits (207), Expect = 2e-103  
Identities = 207/207 (100%), Gaps = 0/207 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```


Query 3      AGCTGCAGTTCTGTCAAGAATGAGTACAGAACCTCGATGCCAATGCATAAAAAACACATTC 62
             |||
Sbjct 107    AGCTGCAGTTCTGTCAAGAATGAGTACAGAACCTCGATGCCAATGCATAAAAAACACATTC 166

Query 63     CACACCTTTCCACCCCAAATTTATCAAAGAATTGAGAGTTATTGAGAGTGGGCCACACTG 122
             |||
Sbjct 167    CACACCTTTCCACCCCAAATTTATCAAAGAATTGAGAGTTATTGAGAGTGGGCCACACTG 226

Query 123    TGAAAATTCAGAAATCATTGTTAAGCTTACCAATGGAAACGAGGTCTGCTTAAACCCCAA 182
             |||
Sbjct 227    TGAAAATTCAGAAATCATTGTTAAGCTTACCAATGGAAACGAGGTCTGCTTAAACCCCAA 286

Query 183    GGAAAAGTGGGTGCAGAAGGTTGTGCA 209
             |||
Sbjct 287    GGAAAAGTGGGTGCAGAAGGTTGTGCA 313
  
```

- Resultados de Blast para amplificadores de TNF- $\alpha$  en glándula mamaria bovina

[gb|EU276079.1|](#)  Bos taurus tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) mRNA,  
complete cds  
Length=740

[GENE ID: 280943 TNF](#) | tumor necrosis factor [Bos taurus] (Over 10 PubMed links)

Score = 496 bits (268), Expect = 4e-137  
Identities = 268/268 (100%), Gaps = 0/268 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      AACAAGCCGGTAGCCCACGTTGTAGCCGACATCAACTCTCCGGGGCAGCTCCGGTGGTGG 60
              |||
Sbjct  294    AACAAGCCGGTAGCCCACGTTGTAGCCGACATCAACTCTCCGGGGCAGCTCCGGTGGTGG 353

Query 61      GACTCGTATGCCAATGCCCTCATGGCCAACGGTGTGAAGCTGGAAGACAACCAGCTGGTG 120
              |||
Sbjct  354    GACTCGTATGCCAATGCCCTCATGGCCAACGGTGTGAAGCTGGAAGACAACCAGCTGGTG 413

Query 121     GTGCCTGCTGACGGGCTTTACCTCATCTACTCACAGGTCTCTTCAGGGGCCAAGGCTGC 180
              |||
Sbjct  414    GTGCCTGCTGACGGGCTTTACCTCATCTACTCACAGGTCTCTTCAGGGGCCAAGGCTGC 473

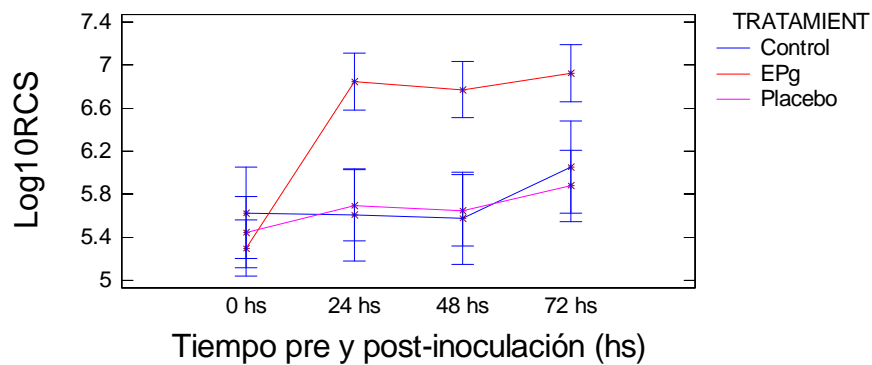
Query 181     CCTTCCACCCCTTGTTTCCTACCCACACCATCAGCCGCATTGCAGTCTCTACCAGACC 240
              |||
Sbjct  474    CCTTCCACCCCTTGTTTCCTACCCACACCATCAGCCGCATTGCAGTCTCTACCAGACC 533

Query 241     AAGGTCAACATCCTGTCTGCCATCAAGA 268
              |||
Sbjct  534    AAGGTCAACATCCTGTCTGCCATCAAGA 561
```



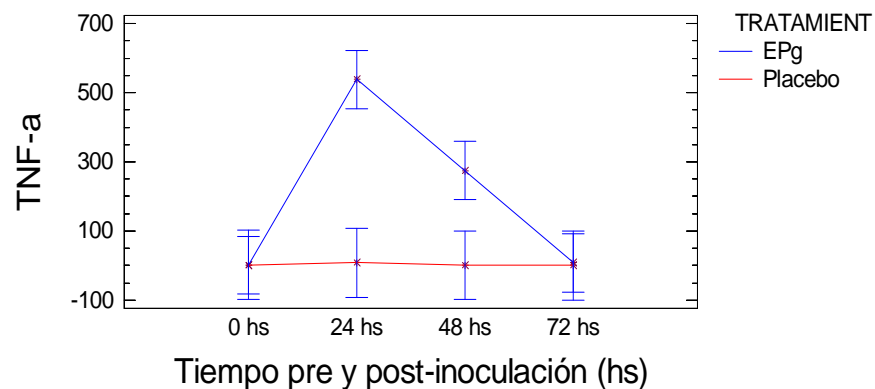
- Gráfica de análisis de interacción  $[(E_T) * (E_t)]$  del punto 4.3. ( $\text{Log}_{10}\text{RCC}$  para cada tratamiento en función del tiempo de muestreo)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos de Confianza



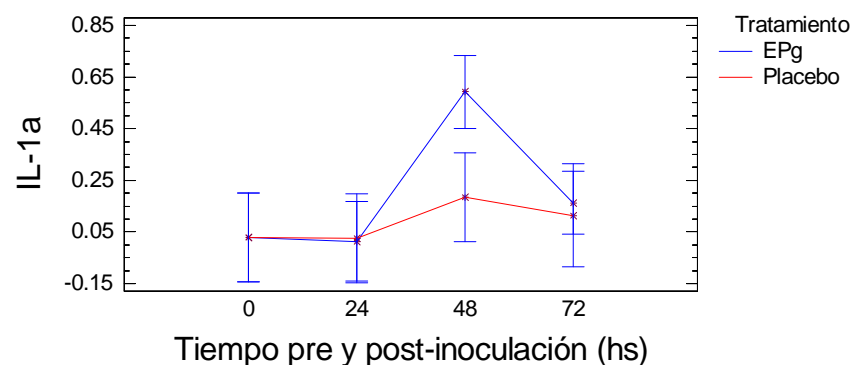
- Gráfica de análisis de interacción  $[(E_T) * (E_t)]$  del punto 4.5.2. (Densidad óptica integrada obtenida para  $\text{TNF-}\alpha$  mediante western blot para cada tratamiento en función del tiempo de muestreo)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos de Confianza



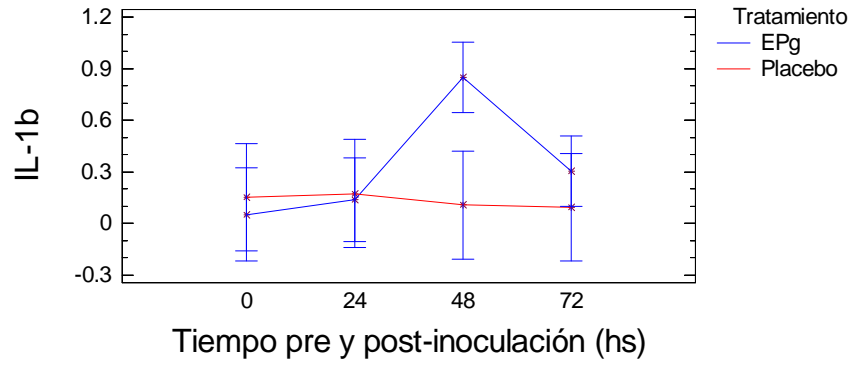
- Gráfica de análisis de interacción  $[(E_T) * (E_t)]$  del punto 4.6.3.1. (Niveles de expresión de  $\text{IL-1}\alpha$  para cada tratamiento en función del tiempo de muestreo)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos de Confianza



- Gráfica de análisis de interacción [(E<sub>T</sub>)\* (E<sub>t</sub>)] del punto 4.6.3.2. (Niveles de expresión de IL-1β para cada tratamiento en función del tiempo de muestreo)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos de Confianza



- Gráfica de análisis de interacción [(E<sub>T</sub>)\* (E<sub>t</sub>)] del punto 4.6.3.4. (Niveles de expresión de TNF-α para cada tratamiento en función del tiempo de muestreo)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos de Confianza

