

DAÑO EN EL TEJIDO MAMARIO DURANTE LA MASTITIS BOVINA (PARTE I)

Autor (es): 1,2 DR. MCS LEONARDO JOSE DE LUCA, 3 DR. MV. NICOLAS CAGGIANO, 2 MARTA CASTRILLON

1 DIRECTOR CIENTIFICO - LABORATORIO BURNET 2 CATEDRA PRODUCCION DE LECHE - FACULTAD CIENCIAS AGRARIAS - UNLZ 3 CATEDRA FISIOLOGIA - FCV - UBA

La mastitis subclínica es la principal forma en los rodeos lecheros modernos, afectando entre el 20 a 50% de las vacas. Su costo es muy difícil de cuantificar.

Resumen



La mastitis, reacción inflamatoria de la glándula mamaria, generalmente causada por una infección microbiana, se reconoce como la enfermedad más costosa en el ganado lechero. El daño en el tejido mamario reduce el número y la actividad de las células epiteliales, lo que incide en una menor producción de leche. Disminución que representa aproximadamente el 70% del costo total de la mastitis. Se ha demostrado que el daño en el tejido mamario es inducido por apoptosis o necrosis. Estos 2 tipos distintos de la muerte celular se pueden

distinguir por cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares en las células que mueren. Tanto factores bacterianos como reacciones inmunes del huésped contribuyen a este proceso. Durante la infección de la glándula mamaria el daño tisular puede ser causado por bacterias y/o sus productos. Ciertas bacterias producen toxinas que destruyen las membranas celulares y dañan las células epiteliales mamarias bovinas, mientras que otras son capaces de invadir y multiplicarse dentro de ellas antes de causar la muerte celular. Simultáneamente se produce la ruptura de la barrera sangre-leche y un influjo en la glándula de células somáticas y neutrófilos polimorfo nucleares entre otras. Cuantas más células inmunes migran, mayor es el daño del epitelio mamario. Es bien sabido que la degradación de la matriz extracelular puede conducir a la muerte de las células epiteliales, en tanto que los neutrófilos polimorfo nucleares pueden dañar el tejido mamario mediante la liberación de intermediarios reactivos de oxígeno y enzimas proteolíticas. Estudios in vivo e in vitro sujetos aún a investigación sugieren que el uso de antioxidantes y otros compuestos protectores en los programas de control de la mastitis pueden ayudar a aliviar el daño a las células secretoras provocado por estos agentes y por lo tanto reducir la pérdida en la producción de leche.

Introducción

La mastitis es definida como una inflamación de la glándula mamaria. Por lo general se produce principalmente en respuesta a una infección intramamaria de tipo bacteriana, por micoplasma, hongos o algas. También puede presentarse por agresiones que predisponen a la infección de la glándula intramamaria (IMI), como consecuencia de un trauma mecánico, térmico o químico. Por lo tanto, la aparición de mastitis, depende de la interacción entre el huésped, el agente causal y los factores ambientales.

La mastitis es la enfermedad infecciosa más costosa del ganado lechero. La prevalencia es relativamente alta. Podemos considerar dos formas de presentación: la mastitis clínica y la subclínica.

La mastitis subclínica es la principal forma en los rodeos lecheros modernos, afectando entre el 20 a 50% de las vacas. Su costo es muy difícil de cuantificar, pero la mayoría de los expertos coinciden en que la mastitis subclínica le cuesta al productor de leche promedio más que la mastitis clínica. Asumiendo una prevalencia del 45% de mastitis subclínica con un costo estimado de 70 al 75% de reducción en la producción de leche, debido a que una gran parte del tejido mamario resulta con daño irreversible. Esto se debe a que los antibióticos son muy útiles para el tratamiento de la infección pero no protegen directamente a la glándula del daño tisular. Esta publicación tratará de describir cómo las bacterias, los neutrófilos polimorfo nucleares (PMN), las proteasas y las citoquinas anfitrionas contribuyen al daño tisular.

Resumen de mastitis

La glándula mamaria está expuesta a diversas bacterias durante la lactancia y en períodos no lactantes. Patógenos frecuentemente aislados de leche con mastitis puede ser clasificados como no contagiosos (la mayoría son del medioambiente) y contagiosos.

Los primeros incluyen *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, especies de *Staphylococcus coagulans* negativos y especialmente un patógeno y destructor *Streptococcus faecalis*, mientras que los segundos (contagiosos) incluyen *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

El pezón y canal del pezón son la primera línea de defensa de la glándula mamaria. El revestimiento de queratina en el canal del pezón proporciona una barrera física y química contra la penetración bacteriana. La infección se produce después que las bacterias ganan la entrada a la glándula mamaria a través del canal del pezón. Éstas pueden escapar de los mecanismos de defensa naturales por multiplicación a lo largo del canal del pezón, especialmente después del ordeño; o por propulsión en la cisterna del pezón por las fluctuaciones de vacío en la punta del pezón durante el ordeño. Superada la defensa anatómica, las bacterias deben evadir los mecanismos de defensa celular y humoral de la glándula para establecer la enfermedad. Si la infección no se controla, los niveles de bacterias en la glándula mamaria finalmente se elevan a un nivel en el cual comienza a producirse daño en el epitelio mamario. Si la infección persiste, el número de células somáticas en la leche aumenta, comienza a perderse la integridad estructural y la barrera sangre-leche se destruye. Esto permite que el fluido extracelular pueda entrar a la glándula y se mezcle con la leche. Cambios visibles en la leche y de las mamas empiezan a ocurrir. Estos pueden incluir inflamación leve a grave.

Por definición, este es el comienzo de los síntomas clínicos. En breve, células epiteliales mamarias bovinas pueden dañarse durante la infección intramamaria por:

- Liberación de una gama de productos celulares y extracelulares de patógenos bacterianos.
- Enzimas lisosomales y productos oxidativos liberados de los fagocitos, durante la fagocitosis de organismos invasores.

- Proteasas de la sangre y citocinas liberados durante la respuesta inmune.

Daño tisular, apoptosis y necrosis

Ensayos de múltiples metodologías y terminologías diferentes han sido utilizados por varios grupos de investigadores para estudiar y describir el daño tisular durante la mastitis. Por lo tanto, sería importante detallar una breve introducción a los tipos de muerte celular.

Hay dos tipos diferentes de muerte celular, la apoptosis y la necrosis, que se pueden distinguir por diferencias en los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares en las células que mueren.

La apoptosis es un proceso de suicidio deliberado de una célula en los organismos multicelulares. La misma puede ser identificada por un patrón característico de cambios morfológicos, incluyendo la condensación nuclear y citoplásmica, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Estos cambios están asociados a la ruptura de cromatina en fragmentos de menor tamaño (oligonucleosoma) provocada por una endonucleasa dependiente de calcio.

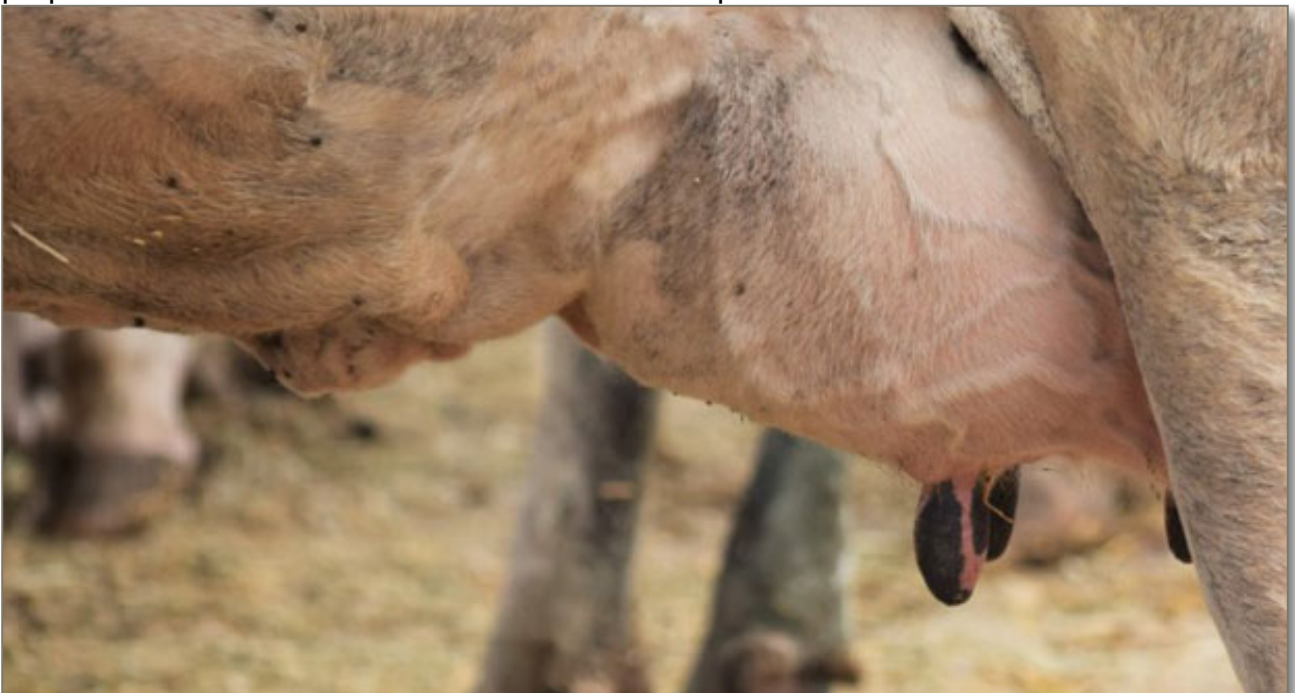
La presencia de este ADN oligonucleosomal en geles teñidos es ahora ampliamente utilizado para detectar la apoptosis. Un etiquetado enzimático de la cadena de ADN al romperse permite detectar el fenómeno mediante la técnica denominada TUNEL (acrónimo en inglés Terminal dUTP Nick End-Labeling), que determina los fragmentos de ADN cortados, marcándolos colorimétricamente, o por fluorometría, mediante un proceso enzimático y visualizándolos en microscopio común, fluorescencia o clitómetro de flujo. Además, la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana celular durante la apoptosis permite mediante tinción de la Anexina V detectar la Fosfatidilserina expuesta como un marcador de apoptosis. También las Caspasas, o estas son proteasas específicas de ácido aspártico, se han utilizado como marcador específico de las vías de apoptosis. Las mismas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de Caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son traslocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las Caspasas iniciadoras.

Las Caspasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre estos se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales y factores de transcripción. Estas proteasas representan un nuevo paradigma de la transducción de la señal y se encuentran implicadas en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos.

A diferencia de la apoptosis, la necrosis se refiere a la muerte accidental de las células en el tejido vivo. Puede seguir a una gran variedad de lesiones, tanto físicas (cortes, quemaduras, contusiones) como biológicas (efectos de los agentes causantes de enfermedades). El signo de necrosis, se llama tejido muerto. Se inicia con la inflamación del citoplasma y mitocondrias causados por una pérdida de integridad de la membrana y termina con la lisis celular total. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular el contenido del citoplasma es volcado al espacio extracelular, produciéndose la atracción de células inmunes en el área y generando el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitos inmigrantes. Estas definiciones y las diferencias aparentemente claras entre apoptosis y necrosis son sin embargo probablemente demasiado simplificadas. Por ejemplo, los cuerpos apoptóticos así como los fragmentos de células restantes, si no son eliminados rápidamente por los fagocitos o las células vecinas, se hinchan y lisan finalmente. Este proceso se denomina necrosis secundaria. Además, la interconexión positiva o negativa entre la autofagia y la apoptosis añade complejidad adicional a la investigación sobre apoptosis.

La citotoxicidad también se usa comúnmente en la literatura para describir el daño tisular, pero no argumentando un mecanismo celular específico aunque indica la propiedad de destrucción celular de un compuesto químico o un mediador celular.

Muchos ensayos se encuentran disponibles para la medición de la citotoxicidad y la mayoría de ellos se basan en el aumento de la permeabilidad de membrana plasmática o aumento de la captación de los colorantes por las células que mueren o células muertas. Los resultados de los ensayos de citotoxicidad varían considerablemente en función del método utilizado. En general, los ensayos de citotoxicidad se pueden utilizar para detectar la necrosis y la etapa tardía de la apoptosis, pero no la etapa temprana de la apoptosis. Para los estudios de la especie bovina y específicamente a nivel mamario, la actividad de la Lactato Deshidrogenasa y N -acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGase) han sido comúnmente utilizados como marcadores de daño tisular. Éstas son enzimas estables citoplasmáticas presentes en todas las células. Las mismas se liberan rápidamente fuera de la célula cuando la membrana plasmática está dañada. Este sistema enzimático se encuentra dentro de los lisosomas de las células epiteliales mamarias; sin embargo, una pequeña fracción de NAGase en la leche también puede venir de los leucocitos.



Daño tisular: observación histológica

Los análisis histológicos han sido ampliamente utilizados desde la década de los setenta y todavía se utilizan hoy en día para evaluar el daño al tejido secretor de la glándula mamaria bovina causada por patógenos causantes de mastitis.

En un trabajo realizado por el autor en el año 2005 se examinó el parénquima mamario de 250 vacas lecheras sacrificadas con patologías de mastitis, con aislamiento de microorganismos y observación de cambios histológicos. De todas las muestras de las vacas en las que se aislaron bacterias, sólo el 3,1% no mostró cambios histológicos mientras que el 96,9% mostraron una respuesta inflamatoria (edema, daño de células epiteliales mamarias e infiltración de PMN), proceso de reparación de tejidos o ambas cosas. En contraste, el 33,9% de las muestras de las glándulas sin evidencia de microorganismos no mostró cambios histológicos. Estos resultados indican claramente que la presencia de microorganismos se asocia con el daño tisular.

Escherichia coli es uno de los patógenos más importantes que causan mastitis en vacas lecheras, lo que resulta en la inflamación de la glándula, que va desde subaguda a hiperaguda.

En diversos experimentos se ha demostrado que durante una severa invasión del epitelio mamario con cepas de *E. coli* se produce necrosis en tanto que en los casos moderados hay un daño mínimo del tejido alveolar (Frost et al., 1986). En el último caso los principales cambios fueron superficiales y se limitaron al epitelio del seno del pezón, senos lactíferos y conductos de gran tamaño, sin afectación grave del tejido secretor aunque con algunas lesiones localizadas de la membrana basal subyacente al epitelio dañado. En los casos muy severos, la infección progresó a través del sistema dúctil para producir una reacción inflamatoria limitada pero con una amplia participación del tejido secretor. En su forma más grave con la multiplicación bacteriana incontrolada se perdieron todo el seno y el epitelio lactífero, el tejido intersticial se convirtió en hemorrágico y con frecuencia el animal murió de toxemia a las pocas horas de la infección.



La gravedad de la enfermedad varía considerablemente de vaca a vaca. Kornalijnslijper et al., 2004 informó que 6 horas después de la inoculación por vía intramamaria, los recuentos bacterianos se correlacionaron significativamente con la gravedad de la enfermedad, variando considerablemente entre individuos, concluyendo que el crecimiento bacteriano en la fase anterior de afluencia masiva de PMN es un determinante importante en la severidad de la mastitis experimental

a *E. coli*.

Para determinar si el Lipopolisacárido de endotoxina (LPS) es responsable del daño tisular mediado por *E. coli*. Cappucco et al., 1984/85 cultivaron explantes de tejido mamario lactante en la presencia de endotoxina *E. coli* y de un filtrado de cultivo de la misma bacteria, los resultados indicaron que la endotoxina no tuvo efecto, pero el filtrado de cultivo dañó el tejido y produjo una disminución de la síntesis y la secreción de leche.

Uno de los tipos más comunes de mastitis crónica es causada por *Staphylococcus aureus*. Respuestas histopatológicas de tejido de vacas lactantes infectadas experimental o naturalmente con este patógeno se estudiaron ampliamente durante los años. Reid et al., 1970 y 1980 examinaron muestras de tejido del parénquima mamario de vacas infectadas naturalmente con esta bacteria e informaron una masiva infiltración de PMN y necrosis de tejidos secretores. Además, observaron que los tejidos mamaros de vacas lactantes inoculados con *Staphylococcus aureus* mostraron menor síntesis y secreción de leche con crecimiento del estroma interalveolar e involución del epitelio alveolar y del espacio luminal, evidenciando el reemplazo de tejido secretor por tejido no secretor. Sordillo (1988) realizó un estudio de exposición con vaquillonas que mostró que las glándulas mamarias infectadas por *Staphylococcus aureus* también exhibieron un menor número de áreas del epitelio alveolar y luminal y más estroma interalveolar que los controles. A partir de estos resultados, se puede concluir que la infección a *Staphylococcus aureus* causa necrosis de los tejidos secretores y que el tejido secretor dañado es reemplazado por tejido no secretor.

Apoptosis durante la mastitis

La inducción de apoptosis por agentes patógenos bacterianos es un proceso celular bien establecido. La apoptosis es una característica clave del desarrollo de la glándula mamaria y de su función. La misma es crítica para la eliminación de las células epiteliales alveolares secretoras de leche durante la lactancia y la involución post-lactacional. La evidencia concluyente y directa de la participación de la apoptosis durante la mastitis la ha proporcionado Long et al., 2001 al estudiar glándulas mamarias infectadas por *Escherichia coli*. Estas fueron biopsiadas y los tejidos resultantes procesados para ARNm, proteína y exámenes histológicos. Los resultados de ARNm y análisis de proteínas indicaron la regulación hacia elevación (up regulation) de la enzima de conversión de los factores proapoptóticos Bax y IL-1 β y una regulación a la baja (down regulation) del factor antiapoptótico Bcl-2. Además, la inducción de una gelatinasa de 92-kDa se observó por zimografía. Finalmente, el número de células apoptóticas epiteliales luego de 10 secciones microscópicas, tal como se determina por el ensayo de TUNEL, aumentó de $1,8 \pm 0,5$ a $8,8 \pm 2,8$ células.

Hubo pruebas para la inducción de la apoptosis por otros patógenos de mastitis. Por ejemplo, Sheffield 1997, informó de la inducción de un marcador supuesto de la apoptosis denominado represor de la mucina 2 prostática ARNm, después de la infección experimental de la glándula mamaria bovina con *Streptococcus agalactiae*. Estudios in vitro indican que *Staphylococcus aureus* causa apoptosis en una línea celular bovina mamaria. Sin embargo, el efecto de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en la apoptosis de tejido mamario todavía tiene que ser confirmado in vivo.

Vale la pena indicar que la apoptosis no causa grandes cambios histomorfológicos, como se observa en los estudios tradicionales de mastitis, pero sí reduce el número de células en el tejido mamario y además puede causar daño a los tejidos de una manera retardada a través de necrosis secundaria.

Los procesos de remoción de células apoptóticas durante la mastitis no están totalmente comprendidos. La depuración de las células apoptóticas por los fagocitos, tales como los macrófagos, se ha demostrado en una infinidad de trabajos. Se sabe además que las células epiteliales mamarias también son capaces de fagocitar células apoptóticas en los bovinos y en otras especies, por ello sería muy importante estudiar a fondo este tema ya que muchas veces los métodos para la detección de la apoptosis se muestren sólo en las células que participan en el proceso y es muy posible que la apoptosis durante la mastitis se subestime.

Fuente.

<http://www.actualidadganadera.com/articulos/dano-en-el-tejido-mamario-durante-la-mastitis-bovina-parte-i.html>

Clic Fuente





MÁS ARTÍCULOS