

DAÑO EN EL TEJIDO MAMARIO DURANTE LA MASTITIS BOVINA

Dr. MCs Leonardo José De Luca (1,2), Vet. Nicolás Caggiano (3), Marta Castrillón (2). (1) Director Científico Laboratorio Burnet. (2) Cátedra Producción de Leche Facultad Ciencias Agrarias UNLZ. (3) Cátedra Fisiología FCV UBA.

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 polimorfonucleares 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 resultó 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 polimorfonucleares (PMN), las proteasas y las citoquinas anfitrionas contribuyen al daño tisular.

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 medio ambiente) y contagiosos. Los primeros incluyen *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, especies de *Staphylococcus coagulasa-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 puede 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 (oligonucleosomal) 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 TÚNEL (acrónimo en inglés Terminal dUTP Nick End-Labeling), que determina los fragmentos de ADN cortados marcándose colorimétricamente, o por fluorometría, mediante un proceso enzimático y visualizándose en microscopio común, fluorescencia o citómetro 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, Cisteína 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 auto proteólisis cuando son trasladadas a comportamientos 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 éstos 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 causado 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 cito plasmáticas 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 1970 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 (De Luca, L. 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. 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 progresa 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 (Kornelija Slijper et al. 2004) informó que 6 h 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 *Escherichia coli*.

Para determinar si el Lipopolisacárido de endotoxina (LPS) es responsable del daño tisular mediado por *Escherichia coli*. (Cappuccino et al 1984/85) cultivaron explantes de tejido mamario lactante en presencia de endotoxina *Escherichia 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. (Reid et al 2002) los examinaron en 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 el mismo 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 2001) al estudiar glándulas mamarias infectadas por *Escherichia coli*. Éstas 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 e IL-1 β (Interleuquina 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.

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 también 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.

Participación de los neutrófilos en el daño celular:

Post detección de la invasión de patógenos en la glándula mamaria, los macrófagos y las células epiteliales liberan factores quimiotácticos. Estos agentes desencadenan la migración de los leucocitos, principalmente los PMN desde la sangre hacia la glándula mamaria y aumentan sus proporciones desde un nivel basal de 5 a 25% a aproximadamente 90% del total de células en la leche. Estos PMN son considerados como la segunda línea de defensa de la glándula mamaria. La presencia de PMN funcional es crucial para la defensa del huésped contra patógenos bacterianos.

Los neutrófilos usan una molécula de adhesión denominada CD62L, también denominada L Selectina, que atrae y hace rodar a los PMN a lo largo del endotelio vascular, de esta manera ellos reconocen el tejido periférico verificando signos de infección. Cuando la molécula de adhesión no se sintetiza, los neutrófilos no migran hacia el tejido mamario infectado dejando a las vacas lecheras muy susceptibles a las mastitis (De Luca, 2005/2010). Esto ocurre cuando las vacas son tratadas con corticoides o cuando los glucocorticoides elevan su concentración en el período peripartal.

Los glucocorticoides trabajan en todas las células uniéndose a un receptor citosólico denominado GR. Esta unión hormona-GR regula los eventos transcripcionales teniendo un efecto profundo sobre la expresión genética, el fenotipo y la función de los neutrófilos y sobre otras células corticoides sensibles. Cuando los corticoides se encuentran elevados en sangre se reduce la transcripción de la proteína CD62L. (Kimura et al., 1999).

Las mastitis Coliformes agudas frecuentemente ocurren en el período postparto inmediato cuando la función de los neutrófilos se encuentra disminuida. La susceptibilidad a las infecciones intramamarias durante el parto se encuentra negativamente correlacionada con el número de neutrófilos circulantes y su actividad metabólica (explosión respiratoria). La expresión de los receptores CD62L (L-Selectina) y CD11/CD18 o B2-Integrinas sobre los neutrófilos sanguíneos se considera de vital importancia para su migración al sitio de la infección. En la fase peripartal esta expresión se encuentra extremadamente reducida (De Luca, 2005).

La habilidad de los animales a resistir infecciones se encuentra asociada a su estado nutricional. La depresión en el suero de la concentración de Vitamina E y Selenio, observada en el post parto de las vacas tiene una enorme influencia en el aumento de las infecciones mamarias debido a la importante inmunosupresión observada. El Selenio y el Zinc juegan un papel muy importante en la disminución de la función inmune. (De Luca, 2005) ha observado que sobre 250 partos en vacas de alta producción, durante la fase peripartal inmediata, la cantidad de leucocitos sanguíneos se eleva considerablemente. Esto se debe a que los corticoides inducen neutrofilia por dos mecanismos: por salida de PMN desde la médula ósea o por marginación de los neutrófilos desde la pared de los vasos sanguíneos por el fenómeno de falla transcripcional de la molécula de adhesión CD62L+. De esta manera la primera línea de defensa celular no llega al lugar de la infección.

Durante la infección mamaria a E. coli se descargan Citoquinas proinflamatorias tales como el TFN-alfa (Factor Necrosante de Tumores) iniciador en el mecanismo protector, pero también causa de daños celulares que ponen en peligro al organismo si ellos se activan por mucho tiempo.

Los eventos que ocurren a nivel cerebral en respuesta al estrés, específicamente en el eje Hipotálamo- hipofiso- adrenal (eje HHA) son similares a aquellos ocurridos en respuesta a un sistema inmune activado. En ambas instancias el eje HHA está estimulado por el

Factor Liberador de Corticotropina (CRF), resultando en una disminución de la regulación de la función inmune (down regulation). En realidad esta down regulation debería proteger al huésped contra una respuesta inmune exagerada. Durante la fase temprana de la mastitis a *E. coli*, los mediadores inflamatorios o Citoquinas se producen localmente debido a la descarga de los Lipopolisacáridos de la pared de la bacteria. La mayor parte de las Citoquinas son secretadas en baja concentración y solo son activas localmente, aunque ellas pueden ser capaces de ganar acceso a la circulación y causar los signos sistémicos de la enfermedad.

Las vacas responden con distinta severidad a la infección a *E. coli* basada en la susceptibilidad individual. La gravedad clínica durante la infección parece estar determinada por una moderada o exagerada secreción de Citoquinas pro-inflamatorias. Una moderada descarga altera la función inmune de una manera apropiada para eliminar los patógenos invasores, cuando la secreción es exagerada o por mucho tiempo se desencadena el denominado shock séptico o endotóxico.

Ambos patrones de descarga de Citoquinas son diferentes, esto explicaría la variación en la susceptibilidad individual de las vacas a la mastitis colibacilar.

Si las endotoxinas o Lipopolisacáridos bacterianos inducen una inflamación aguda en el huésped, ésta se denomina Fase Aguda de Respuesta (FAR), que limita la invasión bacteriana por infiltración de fagocitos en el sitio de la infección. En la fase temprana de la mastitis colibacilar, el TNF alfa (Factor Necrosante de Tumores α), la IL-1 (Interleuquina-1) y la IL-6 (Interleuquina-6) son los responsables de causar los signos locales y sistémicos, tales como, fiebre y pérdida del apetito. Estas Citoquinas, como otros mediadores, también estimulan el eje HHA resultando en un aumento de la producción de cortisol. Los elevados niveles de glucocorticoides desempeñan la función vital fisiológica de prevenir al sistema inmune de sobre-reacciones los cuales pueden causar daño al organismo.

Definitivamente, las principales funciones de PMN son fagocitar patógenos y destruirlos a través de los sistemas de oxígeno-dependientes y oxígeno-independiente. Al mismo tiempo, los PMN pueden dañar potencialmente a la glándula mamaria. El mecanismo exacto por el cual PMN dañan las células epiteliales bovinas durante la mastitis todavía no se entienden completamente. Los neutrófilos pueden promover la lesión tisular y perturbar la función mamaria a través de la generación de oxígeno reactivo (estallido respiratorio) y la liberación de enzima granular (desgranulación).

Las células fagocíticas de la glándula mamaria y del suero son componentes críticos del mecanismo defensivo que protege a estos órganos de la infección y en el caso específico de la glándula mamaria, de la mastitis.

Durante el proceso de fagocitosis la explosión respiratoria produce grandes cantidades de oxígeno reactivo usado para matar los patógenos fagocitados. Estas especies de oxígeno reactivo pueden dañar las células fagocíticas cuando una adecuada cantidad de sistemas antioxidantes no se encuentran en el lugar.

¿Qué son los sistemas oxidantes denominados radicales libres?

El oxígeno es usado en un 90 % a 95% en la respiración mitocondrial en el llamado transporte de electrones relacionado al sistema Citocromo Oxidasa. El 5% a 10% restante es usado por los fagocitos, el sistema microsomal de transporte de electrones (Citocromo P450), en oxidaciones enzimáticas y como sustrato de auto oxidaciones.

En todos estos sistemas se producen superóxidos. El superóxido no es un oxidante agresivo pero puede causar un daño significativo a las moléculas biológicas en una reacción catalizada por el hierro, donde el OH⁻ es un intermediario. Esta es la llamada "Reacción de Fenton", que permite la generación de radicales libres, muy destructivos para los tejidos (Draper, 1990; Fettman, 1991).

Los radicales oxígeno contienen por lo menos un electrón libre en una órbita atómica determinada. La capacidad de un radical libre de causar daño tisular está relacionada a la inestabilidad de ese electrón (O'Brien, 1988).

El superóxido y los radicales libres resultantes son liberados de los sistemas biológicos que los producen, de las siguientes formas:

- Liberación controlada de los radicales libres como parte de la respuesta inmune, denominada "Llamada Respiratoria", que ocurre en los leucocitos fagocíticos con la producción de altos niveles de superóxido. Los granulocitos, macrófagos mononucleares y linfocitos usan a los radicales libres como el H₂O₂, miel peróxidos y superóxidos como una forma de destruir a las bacterias invasoras y destruir tejidos dañados. Estos agentes oxidativos son liberados extracelularmente o dentro de los fagolisosomas y son una respuesta controlada por la activación de caminos metabólicos definidos (Dean y Simpson, 1991)
- Los radicales libres son intermediarios normales en el metabolismo (Golden, 1987). La Xantina Oxidasa, el Citocromo P450, las prostaglandinas, las leucotrieno sintetasas, y la cadena respiratoria mitocondrial generan O₂ y H₂O₂ entre otros. Estos procesos producen cantidades variables de radicales libres y solamente un pequeño escape de ellos desde los sistemas transportadores de electrones de la mitocondria y del aparato microsomal.
- La inflamación incrementa la producción de radicales libres mediante la activación del sistema lipo-oxigenasas dependiente del NADPH. Otras oxidaciones enzimáticas y de autooxidación por sustratos también producen superóxidos (Grisham, 1988).

Situaciones clínicas en las cuales se generan radicales libres:

- Desafío por agentes infecciosos
- Deficiencias en agentes antioxidantes, ya sea uno o varios.
- El período peripartal, cuando las vacas son expuestas a la contaminación bacteriana del tracto reproductivo, en un momento de incremento de las demandas metabólicas y de depleción de antioxidantes, asociada a la producción de calostro y la lactancia.
- Animales de alta producción, que tienen una mayor actividad metabólica y una pérdida mayor de antioxidantes por leche.
- Ingestión o inyección excesiva de oxidantes o catalíticos de las oxidaciones, como el hierro o el cobre.
- Durante los períodos de actividad estral cíclica. En estos períodos existe una capacidad considerable de generar radicales libres durante la esteroidogénesis y durante el crecimiento y atresia de las estructuras ováricas (Riley, 1991).
- La reproducción no es un proceso estéril y en consecuencia, hay un considerable potencial para que las bacterias provoquen un desafío de radicales libres durante la concepción y el desarrollo embrionario temprano.

Los metales de transición en las reacciones de los radicales libres

Como los radicales libres son muy inestables reaccionan con el ambiente bioquímico celular, produciéndose lípidos tóxicos, proteínas reactivas y otros radicales libres, produciendo un daño adicional a los tejidos, al DNA, y al ARNm (Med, 1988).

Los metales de transición son aquellos capaces de cambiar su estado de oxidación por una simple transferencia de electrones. Estos minerales traza son esenciales en sitios activos de Oxigenasas, Oxidasas, Antioxidantes, en el transporte de O₂ y como parte de proteínas transportadoras de electrones. Los elementos trazas son muy estables en su forma combinada sin embargo, bajo ciertas situaciones, el Fe y en menor medida el Cu, pueden, en estado iónico libre, catalizar una cascada de producción de radicales libres, uniéndose en forma variable a las moléculas biológicas y permitiendo al radical OH- atacar en esos lugares (Morehouse, 1988).

El balance entre la producción de radicales libres y su control por los agentes antioxidantes es compleja, ya que los procesos involucrados están muy interrelacionados

y tanto los excesos como las deficiencias de elementos traza pueden actuar como campo propicio.

El Fe y el Cu son necesarios en enzimas protectoras claves como la transferrina, la catalasa y la Cu/Zn Superóxido Dismutasa. Sin embargo, una suplementación exagerada con Fe o Cu, pueden saturar todos los sitios potenciales de unión del mineral con estas proteínas elevando la concentración de estos elementos traza en forma iónica libre, estado en el cual pueden intervenir como catalizadores de reacciones oxidativas. Esto queda en evidencia por las espectaculares muertes repentinas que ocurren en los síndromes de toxicidad aguda y crónica por Cu (De Luca, 2008).

Durante la infección inducida experimentalmente a *Staphylococcus aureus* la migración de PMN a través del epitelio secretor ha sido correlacionado con grandes daños morfológicos. La evidencia directa de que el tejido mamario es dañado por PMN fue proporcionada por Capuco et. al en 1986. En este trabajo, los neutrófilos aislados de las glándulas mamarias de las vaquillonas nulíparas inyectadas con una endotoxina de *E. coli* fueron incubados con los tejidos mamarios de cuartos no infectados. El examen microscópico del co-cultivo in vitro indicó daño celular epitelial como resultado del tratamiento con los PMN. Los PMN de la sangre, activados, fueron citotóxicos para las células epiteliales mamarias posiblemente a través de la liberación de especies reactivas del oxígeno extracelular tales como radicales hidroxilo. El estrés oxidativo puede dañar todos los tipos de biomoléculas (por ejemplo, ADN, proteínas, lípidos e hidratos de carbono) y por lo tanto inducir lesión tisular.

Los PMN bovinos tienen gránulos primarios (azurófilos), secundarios y terciarios. Estos gránulos intracelulares contienen péptidos bactericidas, proteínas y enzimas tales como la Elastasa, otras proteinasas y Mieloperoxidasa que se liberan a través de las vacuolas fagocíticas al ambiente extracelular.

Las enzimas proteolíticas en PMN incluyen proteasas neutras y ácidas. La Elastasa (EC 3.4.21.36) y la Catepsina G (EC 3.4.21.20) son las enzimas predominantes en PMN, otras proteasas incluyen la Tiol Proteasa Catepsina B (EC 3.4.22.1) y el Ácido Proteasa Catepsina D (EC 3.4.23.5). Los PMN activados bovino pueden expresar además la Metaloproteinasas de Matriz (MMP) -9 (Owen et al, 1999).

Los PMN de la leche suelen tener menor actividad enzimática proteolítica total que los de la sangre periférica. El uso de un *Escherichia coli* como modelo de mastitis, realizado por (Haddad et al 2006), muestran que los PMN de la leche tienen menor cantidad de Catepsina y actividad colagenasa que los PMN de sangre periférica. Así, los PMN parecen utilizar una parte de estas enzimas durante su migración al cruzar el endotelio la matriz extracelular (ECM) y el epitelio.

En contraste, (Le Roux et al 2003) reportaron que la Elastasa fue mayor en la leche que en la sangre. La Elastasa está localizada en los gránulos azurófilos de los PMN y su aumento en la leche es probablemente debido a las Citoquinas proinflamatorias tales como IL-6, IL-2 y el Factor de Necrosis Tumoral- α , que aumentan la transcripción de las serina proteasas, incluyendo la Elastasa y la Catepsina G. Así, la cantidad y variedad de enzimas liberadas por los leucocitos PMN en la leche parecen ser afectados por la migración y activación de los mismos.

Las enzimas implicadas en la destrucción de tejido mamario bovino fueron investigadas por (Mehrzaad 2005) mediante el uso de un modelo de mastitis inducida por endotoxina. Se informó que las proteasas de la leche con mastitis hidroliza la caseína, gelatina, colágeno, hemoglobina, proteínas de membrana de glándulas mamarias y la lactoferrina, lo que indicaría que las proteasas de leche con mastitis tienen un amplio espectro de actividades. Además, la implicación directa de las proteasas en el daño celular epitelial fue demostrada por el hecho de que la co-incubación de tejido mamario normal con leche con mastitis causa la degradación del tejido. Por lo tanto, las proteasas liberadas por los leucocitos PMN probablemente participen en el daño tisular mamario durante la mastitis.

Es poco probable que el proceso de diapédesis en sí esté directamente implicado en el daño epitelial. En condiciones normales, los PMN pueden migrar hacia las glándulas mamarias sin dañar el tejido. Además, la diapédesis de los PMN no causan daño perceptible en células epiteliales en un estudio in vitro. Sin embargo, un estado de diapédesis prolongada de leucocitos podría causar daños al tejido del parénquima mamario, lo que resulta en una menor producción de leche. Este daño puede ocurrir a través de varios mecanismos, incluyendo la activación prematura durante la migración, la liberación extracelular de productos tóxicos durante la destrucción de algunos microbios, la eliminación de las células huésped infectadas o dañadas y los desechos como un primer paso en la remodelación de tejidos o el fracaso del huésped de interrumpir las respuestas inflamatorias agudas.

La producción del daño inducido por los PMN está probablemente en parte contenida. Después de la ingestión y la liberación de sus productos químicos, la mayor parte de los PMN de la leche se pierden por inducción de apoptosis. Esto es seguido por la migración de los macrófagos a la glándula mamaria y el atrapamiento de los PMN por estos macrófagos. A través de este proceso, los productos químicos dañinos son amurallados dentro de los PMN que están muriendo, que luego son ingeridas por los macrófagos para minimizar el daño adicional al tejido.

Participación de las bacterias en el daño tisular:

Hay evidencia creciente de que los agentes patógenos utilizan diversos mecanismos para incidir sobre las vías de muerte celular. Un número de agentes patógenos están armados con un conjunto de determinantes de virulencia, que interactúan con los componentes clave de las vías de muerte de la célula huésped o interfiere con la regulación de la transcripción de factores de supervivencia de las células control. (Burvenich, et,al. 2003). Estos factores de virulencia pueden inducir la muerte celular por una variedad de mecanismos, que incluyen:

- Toxinas formadoras de poros, que interactúan con la membrana de la célula huésped y permiten la fuga de los componentes celulares,
- Las toxinas que expresan su actividad enzimática en el citosol del huésped;
- Proteínas efectoras entregadas directamente en células huésped mediante un sistema secretor altamente especializadas de tipo III,
- Superantígenos en las células inmunes diana
- Otros moduladores de la muerte de la célula huésped.

Se ha avanzado mucho en la comprensión del papel de la apoptosis y necrosis en respuesta a la infección bacteriana.

Escherichia coli produce una serie de proteasas, incluyendo las enzimas colágeno líticas, que contribuyen a la degradación de los componentes de la membrana extracelular (ECM) No hay duda de que estas actividades proteolíticas pueden contribuir a la apoptosis y la necrosis de las células epiteliales mamarias. Sin embargo, el grado en que contribuyen aún se desconoce.

Los Lipopolisacáridos también denominados endotoxina son complejos con restos de ácidos grasos como parte lipofílica y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos que forman parte mayoritaria de la capa externa de la membrana de bacterias Gram negativas En su conjunto, forman una capa protectora hidrófila en torno a la célula bacteriana que no puede ser atravesada por moléculas lipófilas.se considera un factor clave para la patogenicidad de esta clase bacteriana. En consecuencia, la infusión intramamaria de LPS de Escherichia coli se utiliza a menudo para estudiar los eventos que ocurren durante la mastitis a Escherichia coli porque imita los síntomas de mastitis de origen natural sin invasión de microorganismos y la producción de toxina, lo que podría causar directamente efectos dañinos en las células epiteliales mamarias.

Cuando los LPS se utilizaron para inducir una respuesta inflamatoria en la glándula mamaria, no se observaron lesiones en las glándulas mamarias. Del mismo modo, los LPS no causa daño en el tejido in vitro en los explantes de tejido bovino mamaria lactante o células epiteliales mamarias. Sin embargo, la posibilidad que la implicación de los LPS en la mastitis inducida por *Escherichia coli* sobre el daño celular no puede ser totalmente descartado, porque los LPS estimulan la expresión de IL-1 por las células T-MAC, una línea de células epiteliales mamarias bovino.

Además, se evidencio que los LPS producen un aumento de la expresión del Activador del plasminógeno Tipo Uroquinasa (UPA). Por lo tanto es posible que el LPS induce la apoptosis o necrosis en células epiteliales mamarias indirectamente a través de la inducción de proteasas o citoquinas pro inflamatorias. En este momento, sin embargo, no hay ninguna evidencia experimental que apoye esta idea, presumiblemente debido a la falta previa de métodos analíticos sensibles.

Las mastitis causadas por bacterias Gram. Negativas, tal como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, y *Enterobacter spp.*, pueden causar una variedad de síntomas de la enfermedad variando desde una simple inflamación local, a severos signos de enfermedad y muerte.

Los signos más severos de la enfermedad ocurren predominantemente en el período post parto inmediato, especialmente en vacas con bajos recuentos de células somáticas.

Una vez que las bacterias pasan el conducto del pezón, durante la lactación, los mecanismos de defensa celular y humoral determinan la supervivencia de la bacteria y la duración y severidad de la infección.

La variación en la susceptibilidad en las vacas postparto temprano se explica por diferencias en el RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) en la leche, el número y función de los neutrófilos circulantes y la velocidad y magnitud de su capacidad para llegar dentro de la glándula mamaria. Este fenómeno es crítico para matar rápidamente al *E. coli* y detoxificar las endotoxinas.

Los signos locales durante la mastitis Coliformes son lineales y están relacionados al número de bacteria presentes en la leche durante el primer día después de la infección. Estos signos están atribuidos a la acción de los Lipopolisacáridos (LPS, endotoxinas), mediados a través de las Citoquinas, tales como las Interleuquinas y el Factor Necrosante de Tumores, los cuales son producidos por las células del sistema inmune de la ubre en respuesta a las endotoxinas.

Los Lipopolisacáridos se unen a las Proteínas de unión, formando un complejo. Este se une a las moléculas CD14 ubicadas sobre los macrófagos y neutrófilos produciéndose de esta manera la síntesis y liberación del Factor Necrosante de Tumores. La respuesta a esta liberación varía extensamente entre vacas, y la severidad de la inflamación depende de la concentración de esta citoquina.

Muchas infecciones por *Escherichia coli* causan casos clínicos agudo, los cuales a veces son auto limitantes y se eliminan espontáneamente entre los 5 a 7 días después de la infección, sin embargo también se han descrito infecciones después de 70 a 90 días del contagio.

Aproximadamente 10 a 15% de las infecciones resultan hiperagudas que frecuentemente se convierten en mastitis crónica, con reagudizaciones frecuentes.

Las infecciones han sido descritas frecuentemente como persistentes en el período seco.

En un estudio reciente hemos podido comprobar que sobre 200 vacas analizadas, el 45% de los casos de Coliformes diagnosticados durante los primeros 90 días de lactancia, surgió en los cuartos que estaban infectados con el mismo patógeno durante el período seco. (De Luca L et al 2010)

Staphylococcus aureus produce toxinas que destruyen las membranas celulares, directamente dañan los tejidos y provocan necrosis en las glándulas mamarias bovinas.

Inicialmente, las bacterias dañan los tejidos que recubren el pezón y cisternas glandulares en el cuarto.

Si no se controla, invaden el sistema de conductos y establecen puntos profundos de la infección en las células secretoras de leche (es decir, los alvéolos). Esto es seguido por el encapsulado de las bacterias por tejido de cicatrización y la formación de abscesos. Se proporcionaron evidencias de que el *Staphylococcus Aureus* indujo apoptosis en las células epiteliales mamarias de la glándula de la especie bovina.

Se demostró que 2 horas después de la internalización de un *Staphylococcus Aureus* se aíslan células MAC-T que exhiben desprendimiento de la matriz, membrana celular moteada, y vacuolización del citoplasma, todos los cuales son indicativos de células sometidas a la apoptosis. Por 18 h, la mayoría de la población de células MAC-T mostró una morfología apoptótica. (Boudjellab, N., Chan-Tang H. S. and Zhao X. 2000.)

Otra evidencia de apoptosis fue la existencia de un patrón de ADN característico positiva con TÚNEL positivo etiquetado típico de las células apoptóticas.

Estos resultados demuestran claramente que después de la internalización, del *Staphylococcus Aureus* escapa del endosoma e induce la apoptosis en células epiteliales mamarias. La apoptosis depende de factores de virulencia global tales como Agr, Sar así como por las Caspasas 8 y 3.

El Agr (gen accesorio regulador) o sistema QS (acrónimo en inglés Quorum sensing o percepción de Quorum) tiene un enorme impacto en el éxito del patógeno en la infección controlando la fisiología y los factores de virulencia. Este sistema Agr sobre regula la expresión de toxinas y la degradación de exoenzimas como las proteasas. Tiene una baja regulación de varias proteínas de adhesión durante la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria.

Aunque todavía no hay evidencia directa que demuestra que *Staphylococcus aureus* induce la apoptosis de las células epiteliales mamarias bovinas in vivo, esto parece probable.

El *Staphylococcus aureus* produce una amplia variedad de exoproteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedad en huéspedes mamíferos. Casi todas las cepas examinadas secretan un grupo de enzimas y citotoxinas, que incluye 4 hemolisinas (α , β , λ , y δ), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas puede ser para convertir los tejidos locales huésped en los nutrientes requeridos para el crecimiento bacteriano. Algunas cepas producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen síndrome de choque tóxico, toxina-1, enterotoxinas estafilocócicas, toxinas exfoliativa y leucocidina.

Las cepas aisladas de casos de mastitis bovina expresaron toxinas α , β , λ y δ , leucocidina, enterotoxinas y coagulasa.

Entre todas las citotoxinas del *Staphylococcus aureus*, la α -Hemolisina ha sido la más examinada. La misma puede inducir la apoptosis y/o necrosis en células eucarióticas, dependiendo de la dosis dada. En dosis bajas, la toxina se une a receptores de superficie celular específicos aún no identificados y produce pequeños poros que facilitan la liberación selectiva de iones monovalentes, lo que resulta en la fragmentación del ADN y la muerte celular característica. A dosis altas, la α -hemolisina inespecíficamente absorbe a la bicapa lipídica y forma poros más grandes en la membrana que son Ca^{++} permisiva, lo que resulta en una necrosis masiva sin fragmentación del ADN.

Otras toxinas bacterianas también podrían tener efectos dañinos en los tejidos mamaros de la especie bovina, pero no se han estudiado intensamente. Glándulas mamarias inoculadas con enterotoxina estafilocócica C sufren degeneración celular epitelial, incluyendo invaginación y vacuolización citoplásmica de las células epiteliales. No está claro si este efecto es debido al aumento de la producción de superóxido por PMN migrado o si se trata de un efecto directo de la enterotoxina en las células epiteliales mamarias.

Definitivamente el *Staphylococcus aureus* continúa siendo el mayor problema para la industria lechera debido a la naturaleza del contagio y a la refractoriedad a los tratamientos habituales. El mismo tiene varios mecanismos de virulencia que le permiten la adhesión, colonización, multiplicación y difusión aún en presencia de componentes celulares y humorales del sistema inmune. La adhesión hacia la superficie de las células epiteliales mamarias o hacia el tejido subepitelial está facilitada en este caso por una proteína de unión, la fibronectina, por los polisacáridos capsulares y por la secreción viscosa que se encuentra sobre la superficie de ciertas cepas.

Los *Staphylococcus aureus* que desarrollan en la leche, producen polisacáridos capsulares que interfieren con la unión o el reconocimiento de anticuerpos y complemento hacia la superficie celular, por lo que los receptores C3b y Fc. sobre los neutrófilos no pueden adjuntarse a las bacterias. Este es un principio similar al ejercido por la Proteína A, la cual se une a la IgG en su fracción Fc. previniendo tanto la opsonización como la fagocitosis.

La resistencia contra los mecanismos de defensa inmunológicos está causada en parte por la habilidad del *Staphylococcus* de multiplicarse en las células del epitelio mamario e incluso en los fagocitos. Una vez que la adhesión y la colonización está establecida, la infección es diseminada y mantenida.

El daño celular directo se inicia con la acción de diversas toxinas, especialmente α y β toxinas, cuya acción se amplifica por el resultado de la respuesta inflamatoria. De esta forma, los pequeños conductos intra-alveolares pueden ser bloqueados, conduciendo a la formación de micro abscesos y pérdida del tejido funcional de la ubre.

El cuadro clínico de la mastitis a *Staphylococcus aureus* es muy diverso y obviamente depende de las propiedades de la virulencia de las cepas infectantes y del funcionamiento del mecanismo de defensa de la vaca.

Luego de la infección, el cuadro clínico puede ser descrito como mastitis clínica, con leche anormal y ubres edematizadas y frecuentemente signos sistémicos de enfermedad (fiebre, depresión, baja producción láctea). Gradualmente, después de varios días, los signos sistémicos desaparecen y la infección se torna crónica o subclínica.

La curación espontánea depende de varios factores, pero en las vacas en plena lactancia (primeros tres meses), la autocura usualmente es menor al 10-20%.

En las infecciones crónicas o subclínicas, el derramamiento del *Staphylococcus aureus* en la leche puede ser continuo, aunque un patrón cíclico de difusión contribuye al aumento del recuento de células somáticas. Cada vez que disminuye el recuento de células somáticas recrudece el derramamiento y difusión de la bacteria, re agudizando y agravando la infección.

La epidemiología de la infección intramamaria a *Staphylococcus aureus*, como de otras bacterias, depende tanto de las características del germen como de la susceptibilidad del huésped. Dentro de las características de este agente patógeno, una muy importante es su patrón invasivo irregular, lo cual complica el diagnóstico. Este patrón irregular no es un rasgo común a todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y muy probablemente, juega un importante rol en la difusión de cepas dentro del rodeo lechero.

Las cepas del *Staphylococcus aureus* pueden ser caracterizadas por su habilidad a resistir a la fagocitosis. Específicamente se ha demostrado que las cepas más comunes son también las más eficientes para evadir las defensas inmunes. Esta última observación es el vínculo entre la característica de la bacteria con la susceptibilidad de la vaca, sugiriendo que el sistema inmune en la ubre juega un rol importante en la epidemiología de esta infección mamaria.

Efectivamente, el *Staphylococcus aureus* tiene una extensa interacción con el sistema inmune no solo durante las fases de invasión y colonización sino también durante la curación ya que su porcentaje depende de la actividad de las células inmunes. Por ejemplo la actividad fagocítica puede estar elevada, como dijimos, por la presencia de

anticuerpos opsonizantes, con la presencia de cápsulas o pseudo cápsulas estos anticuerpos deben estar sobre las estructuras capsulares y su producción depende de la actividad de los Linfocitos T, sin embargo estas células se encuentran hiporreactivas cuando los cuartos están infectados con *Staphylococcus Aureus*.

Esta condición se debe a la producción de superantígenos (endotoxinas) producidas por las cepas más patógenas de *Staphylococcus Aureus*. La infección intramamaria definitivamente se encuentra asociada con diferentes respuestas de los sistemas o factores inmunes de la leche. La proporción de PMN (Polimorfonucleares), su viabilidad y la actividad NAGase* (N-acetil- β -D-glucosaminidasa*) se encuentran elevadas, mientras que la lisozima y la explosión respiratoria de los PMN se encuentra baja en la leche de los cuartos afectados comparados con los sanos.

La reducción de la actividad de la lisozima es el resultado de un agotamiento precoz de los PMN, mientras que la deficiencia en la explosión respiratoria se debe a una actividad deficiente de los neutrófilos. Definitivamente durante las fases tempranas de la infección se eleva el recuento de neutrófilos en la leche de los cuartos enfermos. Si la infección perdura los PMN se agotan precozmente y los que llegan al lugar presentan una deficiente actividad fagocítica. Si a esta condición relacionada al tipo de bacteria actuante se le agrega un desbalance o deficiente ingesta de minerales/ vitaminas antioxidantes el desencadenamiento de la infección intramamaria se agrava a veces hasta la pérdida total del cuarto afectado.

NAGase* "es una enzima responsable de la degradación de los Mucopolisacáridos y Glucoproteínas de las células. Esta enzima se encuentra en los lisosomas de todas las células del organismo en bajas concentraciones. Su elevación detecta inflamaciones agudas cuando se detecta la presencia de altos recuentos en leche de leucocitos Polimorfonucleares

Participación de proteínas plasmáticas y citoquinas en el daño tisular:

En el inicio de la mastitis, el aumento de la permeabilidad de la barrera sangre-leche epitelial mamaria conduce primero a una afluencia de los componentes de suero, tales como plasminógeno y numerosas otras enzimas, y segundo a un reclutamiento masivo de células somáticas, en particular, La leche contiene 2 sistemas de proteinasas derivados de la sangre, uno de los cuales está involucrada en la disolución de coágulos de sangre (es decir, la plasmina) y el otro en la defensa contra los microorganismos invasores (es decir, proteinas lisosómicas de las células somáticas). Considerando que la plasmina es la proteinasa principal en la buena calidad de la leche, otras proteinasas, incluyendo catepsina y elastasa, son probablemente también activas, en particular cuando el recuento de células somáticas de la leche aumenta. Esto es sustentado por la observación de que las actividades de la proteasa de plasmina y leche con mastitis difieren. Además, las células epiteliales mamarias también expresan Metaloproteinasa MMP y serina proteasas, que están implicados en la activación de plasminógeno a plasmina (Banku. and Ansorge S. 2001)

El sistema activador de plasminógeno a plasmina en la leche bovina se correlaciona estrechamente con la involución gradual. La plasmina degrada directamente las proteínas de la matriz tales como la fibrina, y laminina y también activa precursores de MMP, tales como pro-MMP-3, MMP- 9 y MMP-13 (Rudolph-Owen, L. A., and L. M. Matrisian. 1998.)

El aumento de la actividad de la plasmina durante la mastitis está relacionado con la permeabilidad de la barrera epitelial durante la inflamación. Además, numerosos activadores de la plasmina y su pro enzima o zimógeno provienen de la circulación sanguínea, de los PMN, y de las bacterias.

Durante la mastitis, la concentración del activador proteasa de serina, incluyendo aquellos para la plasmina y el plasminógeno en la sangre y también en la leche, aumenta

bruscamente. Los neutrófilos polimorfonucleares tienen un pool de activadores de plasminógeno, tal como uPA (Activador de Plasminógeno tipo Uroquinasa) y en menor medida activadores del plasminógeno tisular tPA. Algunas bacterias, como *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, expresan un receptor de plasminógeno en sus superficies que lo activa y expresa en plasmina luego de su inmovilización. Cuánta plasmina contribuye al daño tisular durante la mastitis es discutible. La viabilidad de las células epiteliales mamarias depende de su unión a la Matriz Extracelular (ECM), así es que es razonable postular que la degradación de ECM está implicada en el daño tisular y la muerte celular durante la mastitis. La expresión de MMP-9, ARNm para estromelina-1 y uPA también se incrementan en asociación con la apoptosis durante la mastitis a *E. coli*.

La MMP-9 es producida por PMN bovino y por células T MAC. La Estromelina-1 contribuye a la ruptura de la mayoría de los componentes de ECM, incluyendo laminina y colágeno tipo IV. Otras proteasas que se han reportado elevadas en la leche de vacas con mastitis incluyen MMP-2 y una Gelatinasa de 120 kDa.

También se evaluó la actividad proteolítica sobre el tejido normal mamario de vacas con mastitis. Encontraron que el lactosuero proveniente de vacas con mastitis era más proteolítica que el lacto suero de leche de vacas normales. El Lacto suero de vacas con mastitis exfolia las células y proteínas que las rodean, dejando una red desnuda de colágeno denso. Estas diferencias resultaron de contenidos y actividades de proteasa, que eran significativamente más altos en leche con mastitis. Se llega a la conclusión que el daño con proteólisis tisular observada eran en gran parte debido a MMP. Sin embargo, la posible contribución de otras proteasas no debe ser ignorada.

Las citoquinas son mediadores centrales de los eventos inflamatorios durante la Infección Intramamaria (IMI). Las bacterias liberan toxinas potentes que activan las células blancas de la sangre y las células epiteliales de la glándula mamaria para secretar citoquinas. El desafío intramamario con *E. coli* o *Staphylococcus aureus* ha provocado respuestas inmunes innatas diferenciales en términos de síntomas clínicos y de perfiles de la leche de citoquinas a nivel de proteínas. La diferencia en los perfiles de citoquinas puede ser la base de las diferencias en el seguimiento de los síntomas de estos 2 tipos de mastitis.

Muy poco trabajo se ha llevado a cabo para determinar el papel de las Citocinas en la regulación del daño tisular durante la mastitis. Las Citoquinas reclutan PMN que funcionan como fagocitos en el sitio de la infección. Durante un estudio sobre la utilización de IL-8 recombinante bovino (rb) como un potencial agente terapéutico para la mastitis subclínica de vacas lecheras se observó un aumento significativo en el recuento de células somáticas de leche y en la actividad de quimioluminiscencia después de la inyección intramamaria de rbIL-8.

Aunque no estudiaron el daño a los tejidos, los niveles altos de los recuentos de células somáticas de leche y la producción de radicales libres, sin duda han dado lugar a daño tisular. Previamente se ha informado de que rbIL-8 puede inducir la migración de PMN a través de un modelo *in vitro*.

Otras citoquinas, tales como factor de necrosis tumoral- α e IL 1-, inducen la apoptosis en una variedad de tipos de células, incluyendo células endoteliales bovinas y células epiteliales mamarias humanas. Los niveles de estas citoquinas aumentan durante la mastitis a *Escherichia coli* y es tentador suponer que también inducen apoptosis en células epiteliales mamarias bovinas. Una gama de citoquinas también se conocen para promover una amplia variedad de funciones de los PMN, incluyendo la adhesión, la expresión del receptor de superficie, producción de radicales libres, y la liberación de los constituyentes lisosomales. Por lo tanto, los efectos de las citoquinas en el daño tisular son más propensos a ser mediada a través del reclutamiento y activación de PMN.

Reduccion de los daños tisulares:

Aunque los mecanismos subyacentes sobre el daño tisular durante la mastitis no han sido totalmente delineados, hay oportunidades posibles para la intervención farmacológica para bloquear la cascada proteolítica u oxidativa dentro de la glándula inflamada para reducir el daño tisular durante la mastitis. Hasta ahora, la mayoría del trabajo en esta área se ha centrado en la reducción de radicales libres, porque los resultados de la investigación utilizando modelos in vitro indican que el LPS induce la producción de radicales libre por los PMN y de esta manera producen daño sobre las células epiteliales. Los radicales libres principales encontrados en los sistemas biológicos son superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y radicales de ácidos grasos. El peróxido de hidrógeno se encuentra principalmente en el citosol de las células, y los radicales de ácidos grasos se encuentran principalmente en las membranas celulares. Los radicales superóxido e hidroxilo se puede encontrar en ambos componentes celulares. Debido a que los radicales libres son extremadamente tóxicos para las células, el cuerpo ha desarrollado un sistema antioxidante sofisticado.

La Superóxido Dismutasa convierte el superóxido en peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se convierte en agua por la enzima Glutación Peroxidasa. Las 2 enzimas controlan eficazmente los radicales libres dentro del citosol. En consecuencia, el uso de antioxidantes para prevenir el estrés oxidativo se ha estudiado en varios tipos de inflamación.

Utilizando un modelo de cocultivo de PMN activados bovino y células MAC-T, se encontró que 3 antioxidantes (es decir, la Catequina, Deferoxamina o Glutación Éster Etílico) podría eliminar parcial o totalmente el efecto perjudicial de los PMN bovino activada con MAC-células T, lo que indica que los antioxidantes pueden ser herramientas eficaces para la protección de tejido mamario contra PMN inducida por el estrés oxidativo durante la mastitis bovina.

Los efectos protectores de estos antioxidantes sobre PMN inducida por daño en las células mamarias fueron evaluados in vivo usando un modelo de mastitis inducida por endotoxina. La extensión del daño celular se evaluó mediante la medición de niveles en la leche de la lactato deshidrogenasa y la actividad NAGase.

Infusiones intramamarias de Catequina o glutación éster etílico no ejerció ningún efecto protector, mientras que con la infusión de Deferoxamina, un quelante de hierro, se produjo una disminución de la deshidrogenasa de lactato en leche y la actividad NAGase, lo que indica un efecto protector contra el daño inducido por PMN.

El efecto protector de la Deferoxamina fue también evidente a partir de un nivel más bajo de la Haptoglobina en la leche. La actividad proteolítica de la leche con mastitis no fue influenciada por la presencia de la Deferoxamina. En general, estos resultados indican que la infusión local de Deferoxamina puede ser una herramienta eficaz para proteger el tejido mamario contra PMN inducida por el estrés.

Frecuentemente hay casos de mastitis un único tratamiento con antibióticos con frecuencia no produce resultados terapéuticos satisfactorios a pesar de la existencia de patógenos susceptibles. Una mejora significativa en el potencial de curación, así como una reducción en la duración de la infección se puede lograr utilizando enzimas proteolíticas como la quimotripsina, tripsina y papaína. Las enzimas proteolíticas promueven los mecanismos de defensa inmune en la ubre y tienen un efecto directo sobre la inflamación de la mama causada por bacterias, levaduras y algas alterando la membrana celular y de esta de esta manera alteran su crecimiento.

Además, las enzimas proteolíticas destruyen las secreciones purulentas, coágulos y otras proteínas que contienen productos de inflamación, tales como la fibrina. Por lo tanto los conductos lácteos bloqueados por los productos de inflamación están despejados,

mientras que los agentes patógenos y también toxinas bacterianas puede ser eliminada por el ordeño.

Definitivamente el tratamiento de la mastitis se mantiene como un reto hasta hoy debido a la existencia de cepas resistentes a los antibióticos. El mal uso y a largo plazo de los antimicrobianos ha dado lugar a cepas resistentes a múltiples fármacos. Hay una necesidad urgente de encontrar alternativas a los antibióticos sintéticos.

La situación actual de resistencia de los microorganismos a los antibióticos convencionales ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas siendo los péptidos antimicrobianos (PAM) el objetivo más procurado. Estos PAM han surgido en los últimos 25 años como una familia de sustancias con gran potencial para uso clínico, debido a sus múltiples mecanismos de acción, amplio espectro de actividad y bajo potencial de resistencia. Estos péptidos antimicrobianos se han encontrado en casi todos los seres vivos, desde los procariotas, con las bacteriocinas, a los eucariotas, como mamíferos, anfibios, insectos y plantas con una familia diversa de péptidos.

El espectro de actividad de los péptidos antimicrobianos es amplio. Se encuentra actividad antiviral, antifúngica, antibacteriana e, incluso, en algunos casos, antitumoral. Sus mecanismos de acción son múltiples e incluyen interacciones con la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, con funciones inmunomoduladoras, quimiotácticas y en el proceso de cicatrización. Existen en el momento varios productos en estudio clínico de fase II y III, que se utilizan de forma tópica o intravenosa para el tratamiento de infecciones localizadas y sistémicas; por lo tanto, es importante para la futura práctica clínica conocer los aspectos más relevantes de este nuevo grupo de medicamentos, desde sus mecanismos de acción, y algunos puntos esenciales para su uso clínico. La utilización de una combinación de Polimixina B (como péptido antimicrobiano) con enzimas como Tripsina y Papaina es una alternativa de terapéutica en mastitis rebeldes y reincidentes.

Las Polimixinas ejercen sus acciones (bacteriostáticas o bactericidas, en función de la concentración y de la sensibilidad del microorganismo) actuando sobre la membrana celular de las bacterias Gram negativas, de resultados de lo cual se modifica la permeabilidad, inestabilizando la pared celular (Gram negativas), desencadenándose la lisis bacteriana.

Las bacterias Gram positivas son resistentes a las polimixinas (polimixina-b y polimixina-E).

Las Polimixinas se unen por enlace covalente a los residuos de agarosa del lipopolisacárido de membrana (LPS): el fragmento poli catiónico de la Polimixina desplaza a los cationes Ca^{+2} y Mg^{+2} que estabilizan al LPS en la fachada externa de la membrana celular. La unión de la Polimixina a los residuos de agarosa puede ser antagonizada por ambos cationes divalentes. La formación del complejo entre la Polimixina y el LPS se facilita por la interacción hidrofóbica entre el lípido A del LPS y el ácido graso que es parte de la estructura química del antibiótico. La interacción con el antibiótico da lugar a la liberación del LPS desde la membrana celular y la consiguiente desestructuración de la membrana celular. Y, como se ha escrito en el párrafo anterior, la permeabilidad selectiva de la membrana celular se altera, desencadenándose la lisis de la bacteria.

Actividad antiendotoxina:

Las Polimixinas son los únicos antibióticos conocidos que manifiestan una potente actividad anti endotoxina, además de sus efectos antibióticos. Esta característica puede resultar muy importante en pacientes que sufren una sepsis por Gramnegativos con un elevado riesgo de "shock" mediado por endotoxinas.

La Polimixina-b inhibe la síntesis y liberación por los macrófagos de interferón γ , Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) e Interleucina. La liberación de estos mediadores inmunitarios por parte de los macrófagos se desencadena a consecuencia de los cambios conformacionales del lipopolisacárido (LPS) de membrana celular, la diana de las

polimixinas. En animales de experimentación, el LPS inhibe la coagulación intravascular y la leucopenia; la reacción de Schwartzman, la inflamación asociada con meningitis por Gram negativos, y el “shock” mediado por endotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA:

Fuente.

<https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/dano-tejido-mamario-durante-t32519.htm>

Clic Fuente



MÁS ARTÍCULOS