

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

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**

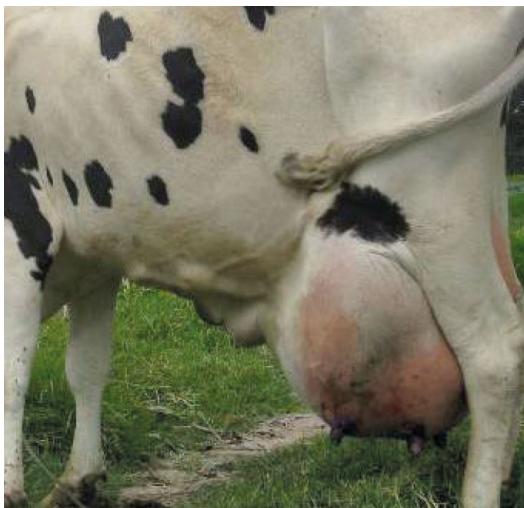
Cuando se desencadena la migración de los leucocitos, desde la sangre hacia la glándula mamaria, aumentan sus proporciones hasta un 90% del total de células en la leche.

Participación de los neutrófilos en el daño celular

Postdetección 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 ata y hace rolar 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 periparto 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 postparto de las vacas tiene una enorme influencia en el aumento de las infecciones mamarias debido a la importante inmunodepresión 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 demarginación 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 corticotrofina (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 proinflamatorias. 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 las 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:

1. Liberación controlada de los radicales libres como parte de la respuesta inmune,

denominada Llamarada 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, mieloperóxidos 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).

2. 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.

3. 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

1. Desafío por agentes infecciosos.
2. Deficiencias en agentes antioxidantes, ya sea uno o varios.
3. 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.
4. Animales de alta producción, que tienen una mayor actividad metabólica y una pérdida mayor de antioxidantes por leche.
5. Ingestión o inyección excesiva de oxidantes o catalíticos de las oxidaciones, como el hierro o el cobre.
6. 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).
7. 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 repentina 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., 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 Metaloproteinasa 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 *E. coli* como modelo de mastitis, realizado por Haddadj 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-a, 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 Mehrzad (2005) mediante el uso de un modelo de mastitis inducida por endotoxina. Se informó que las proteasas de la leche con mastitis hidrolizan 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. Ésto 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.

Estos factores de virulencia pueden inducir la muerte celular por una variedad de mecanismos, que incluyen: 1) toxinas formadoras de poros, que interactúan con la membrana de la célula huésped y permiten la fuga de los componentes celulares; 2) las toxinas que expresan su actividad enzimática en el citosol del huésped; 3)

proteínas efectoras entregadas directamente en células huésped mediante un sistema secretor altamente especializadas de tipo III; 4) súper antígenos en las células inmunes diana; y 5) otros moduladores de la muerte de la célula huésped. Fuente.

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

Clic Fuente



MÁS ARTÍCULOS