



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

*Tesis presentada para optar por el grado académico de Doctor en
Ciencias Biológicas*

***“Aplicación de Panax ginseng como inmunomodulador
intramamario durante el periodo de involución de la
glándula mamaria bovina”***

Autora: Lic. Celina Baravalle

Director: Dr. Hugo H. Ortega

Co-Director: PhD. Luis F. Calvinho

Laboratorio de Biología Celular y Molecular

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional del Litoral

***“Los investigadores alimentamos el instinto de saber;
somos operarios del patrimonio intelectual de la humanidad”.***

*José Maria Martin Senovilla
(1961) Físico español*

Dedicada a mi Papá...

...A mi mamá y a mis hermanos Francisco y Eugenia, por sus consejos y aguante.

...A Sebastián, por su inmensa paciencia... y fundamentalmente por su amor.

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores, el Dr. Hugo H. Ortega y Dr. Luis F. Calvino, porque siempre fueron fuente de conocimiento, orientación, apoyo, paciencia, y por estar comprometidos en su tarea en cuanto a mi trabajo de investigación.

A la Dra. Bibiana Dallard, que siempre me guió, me ayudó y sobre todo por compartir todos sus conocimientos conmigo, aguantarme y brindarme calma.

A mis queridos amigos y compañeros de trabajo... Natalia Alfaro, Carolina Panzani, Melisa Velázquez, Ayelén Amweg, Fernanda Rodríguez, Elizabet Pereyra, Valeria Ruffino, Soledad Heffel, Matías Stangaferro, Raquel Pastor, Adrián Perri, Valentina Matiller, Rocío Marini, Luciana Fullana, Leandro Neme y Belkis Marelli, que no solo me ayudaron en tareas de laboratorio sino que también estuvieron cuando por esas cosas cotidianas de la vida necesitaba palabras de aliento.

A las Doctoras Natalia Salvetti y Florencia Rey, por brindarme siempre sus conocimientos en cuanto a tareas experimentales, y por aconsejarme en cuestiones de la vida.

A mis compañeras Mónica Cadoche y Silvina Pujato, por confiar en mí y por permitirme crecer profesionalmente.

A la Dra. Carina Porporatto, por brindarme sus conocimientos y estar siempre dispuesta cuando la necesité.

A Eduardo Baravalle y la gente de ALECOL, por permitir que parte de este trabajo experimental se realice.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y al Doctorado en Ciencias Biológicas por dar el marco académico para el desarrollo de la presente tesis.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por darme un lugar en su casa de estudios para que pudiera crecer como profesional.

A la Universidad Nacional del Litoral que a través del otorgamiento de subsidios y becas permitió la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Histología de la glándula mamaria bovina	2
1.2. Inmunidad de la glándula mamaria	4
1.2.1. Defensas residentes de la glándula mamaria	6
1.2.1.1. Barreras anatómicas	6
1.2.1.2. Defensas celulares	7
1.2.1.3. Defensas solubles	12
1.2.2. Defensas inducibles de la glándula mamaria	19
1.2.3. Defensas reclutadas de la glándula mamaria	20
1.3. Involución de la glándula mamaria bovina	21
1.3.1. Fase de involución activa	21
1.3.2. Fase de involución estable	22
1.3.3. Fase de calostrogénesis	23
1.3.4. Citología presente en la involución	23
1.4. Inmunomodulación en la glándula mamaria	24
1.4.1. Mecanismos de acción	26
1.4.1.1. Inmunomoduladores de acción inespecífica	26
1.4.1.2. Inmunomoduladores de acción específica	27
1.4.2. Compuestos inmunomoduladores	27
1.5. <i>Panax ginseng</i> como Modificador de la respuesta biológica	29
1.5.1. Propiedades de <i>Panax ginseng</i>	29
1.5.2. Antecedentes como inmunomodulador	30
2. OBJETIVOS	32
2.1. General	33
2.2. Específicos	33

2.3. Accesorio	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Extracto de <i>Panax ginseng</i> (EPg)	35
3.1.1. Ensayos dosis-respuesta	35
3.2. Animales y diseño experimental	37
3.3. Inspecciones clínicas	37
3.4. Recuento de células somáticas	38
3.5. Recolección de muestras de leche para técnicas de Biología Molecular	38
3.6. Toma y procesamiento de las muestras de tejido mamario	38
3.7. Inmunohistoquímica sobre muestras de tejido mamario	39
3.7.1. Controles de la técnica	40
3.7.2. Procedimiento general de IHQ indirecta	40
3.8. Análisis digital de imágenes	42
3.9. Cuantificación de la IHQ	43
3.9.1. Evaluación y cuantificación de la proliferación celular	43
3.9.2. Evaluación de la inmunidad innata	43
3.9.2.1. <i>Cuantificación de la inmunoespresión de citoquinas</i>	43
3.9.2.2. <i>Cuantificación de monocitos-macrófagos mediante la expresión de</i>	44
<i>CD14</i>	
3.10. Western blot a partir de muestras de leche y tejido mamario provenientes del ensayo con el EPg.	44
3.10.1. Preparación de muestras para western blot	44
3.10.2. Corrida electroforética y electrotransferencia	45
3.10.3. Inmunodetección para determinar la especificidad de los anticuerpos	46
utilizados en IHQ. Inmunodetección de TNF- α en muestras de leche y de tejido mamario	
3.11. Extracción de ARN total a partir de muestras de leche provenientes del ensayo con el EPg	47
3.12. Transcripción reversa (RT) y análisis de la expresión de citoquinas mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final	48
3.12.1. RT de ARN total proveniente de muestras de leche	48
3.12.2. Caracterización de la síntesis de citoquinas por PCR	48
3.12.3. Controles	49
3.12.4. Procedimiento general de la técnica	50
3.12.5. Visualización de resultados y análisis de imágenes	51
3.13. Método directo de conteo de células somáticas de leche como alternativa a la	51

citometría de flujo	
3.13.1. Animales y diseño experimental	51
3.13.2. Método directo de conteo de células somáticas - Extendidos de leche	52
3.13.2.1 <i>Inmunohistoquímica sobre extendidos de leche</i>	52
3.13.2.1.1. <i>Detección de células epiteliales</i>	52
3.13.2.1.2. <i>Controles de la técnica</i>	53
3.13.2.2. <i>Toma de imágenes y análisis de las IHQ en extendidos</i>	53
3.13.3. Citometría de flujo para la validación del método directo	54
3.13.3.1. <i>Detección de antígeno de superficie (expresión de CD14)</i>	55
3.13.3.2. <i>Marcación de antígenos intracelulares (citoqueratinas)</i>	55
3.13.4. Análisis de correlación entre poblaciones celulares cuantificadas por IHQ	56
en extendidos y por Citometría de Flujo	
3.14. Evaluación estadística	56
3.15. Normas éticas y de bioseguridad	57
4. RESULTADOS	58
4.1. Ensayos dosis – respuesta	59
4.1.1. Recuento de células somáticas e inspecciones clínicas	59
4.2. Inspecciones clínicas	60
4.3. Recuento de células somáticas	61
4.4. Inmunohistoquímica sobre muestras de tejido mamario	62
4.4.1. Proliferación celular	62
4.4.2. Inmunidad innata por inmunohistoquímica	64
4.4.2.1. <i>Cuantificación de la inmunoexpresión de citoquinas</i>	64
4.4.2.1.1. <i>Inmunomarcación para TNF- α</i>	64
4.4.2.1.2. <i>Inmunomarcación para IL-1α</i>	68
4.4.2.1.3. <i>Inmunomarcación para IL-6</i>	72
4.4.2.2. <i>Cuantificación de monocitos-macrófagos mediante la expresión de</i>	76
<i>CD14</i>	
4.5. Western blot a partir de muestras de leche y tejido mamario provenientes del ensayo con el EPg	79
4.5.1. Especificidad de los anticuerpos anti-IL-6 y anti-IL-1 α utilizados en IHQ	79
4.5.2. Western blot para detección de TNF- α a partir de muestras de leche	79
4.5.3. Western blot para detección de TNF- α a partir de muestras de tejido mamario	81
4.6. Transcripción reversa (RT) y análisis de la expresión de citoquinas mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final	82

4.6.1. Detección de transcritos de ARN mensajero de citoquinas en leche provenientes del ensayo con el EPg	82
4.6.2. Análisis de la cinética para la estandarización de cada par de cebadores para las distintas citoquinas detectadas en leche	83
4.6.3. Caracterización de la síntesis de citoquinas por PCR	84
4.6.3.1. Niveles de expresión de IL-1 α	85
4.6.3.2. Niveles de expresión de IL-1 β	87
4.6.3.3. Niveles de expresión de IL-8	88
4.6.3.4. Niveles de expresión de TNF- α	89
4.7. Método directo de conteo de células somáticas de leche como alternativa a la citometría de flujo	91
4.7.1. Cuantificación de células somáticas por IHQ en extendidos de leche - Método directo	91
4.7.2. Cuantificación de células por Citometría de Flujo	93
4.7.2.1. Cuantificación de monocitos-macrófagos mediante la determinación del antígeno de superficie CD14	93
4.7.2.2. Cuantificación de células epiteliales mediante la determinación de antígenos intracelulares (citoqueratinas)	94
4.7.3 Resultados de correlaciones entre las poblaciones celulares halladas por IHQ en extendidos y CF	96
4.7.3.1 Células AE1-AE3+ (IHQ) vs. Células AE1-AE3+ (CF)	96
4.7.3.2 LPMN (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)	97
4.7.3.3. LPMN y leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)	97
4.7.3.4. Leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)	98
4.7.4. Análisis de correlación entre ambas técnicas sin considerar las muestras con elevado RCS	98
4.7.4.1. LPMN (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)	98
4.7.4.2. LPMN y leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)	99
4.7.4.3 Leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)	100
5. DISCUSIÓN	101
5.1. Ensayo dosis – respuesta	102
5.2. Efecto del EPg sobre la proliferación celular en el periodo de involución	103
5.3. Efecto del EPg sobre la inmunidad innata en el periodo de involución	104
5.3.1. Expresión de TNF- α	104
5.3.2. Expresión de IL-1 α	107

5.3.3. Expresión de IL-6	109
5.3.4. Efecto del EPg sobre la cuantificación de monocitos-macrófagos. Expresión de CD-14	110
5.4. Efectos del EPg sobre la expresión de citoquinas en secreción mamaria	111
5.5. Transferencia de los resultados hallados	113
5.6. Método directo de conteo de células somáticas de leche como alternativa a la citometría de flujo	114
6. CONCLUSIONES	117
7. BIBLIOGRAFÍA	121
8. ANEXO I	148
9. ANEXO II	155
10. ANEXO III	161

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNsc	Ácido desoxirribonucleico simple cadena
ALT	Ácido lipoteicoico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grados centígrados
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
CEF	Factor estimulante de colonias
CEM	Células epiteliales mamarias
cm	Centímetro
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
DAB	Diaminobencidina
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DOI	Densidad óptica integrada
DTT	Ditiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPg	Extracto de <i>Panax ginseng</i>
Fe	Hierro
FN-κB	Factor nuclear-κB
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
hs	Horas
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
Ig	Inmunoglobulinas
IHQ	Inmunohistoquímica
IIM	Infecciones intramamarias
IL	Interleuquina
INF-γ	Interferón-gamma
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
kDa	Kilodaltons
Kg	Kilogramo
LF	Lactoferrina
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
LPS	Lipopolisacárido
mA	Miliamperio
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
Nro.	Número
ON	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico sintetasa

PA	Proteína activadora
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
PAL	Péptidos antimicrobianos linguales
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
RRP	Receptores para reconocimiento de patrones
PAT	Péptidos antimicrobianos traqueales
PBS	Buffer fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PGN	Péptidoglicanos
PI	Post-inoculación
PM	Peso molecular
RA	Recuperación antigénica
RCS	Recuento de células somáticas
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a Reacción en cadena de de la polimerasa
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SC	Subcutánea
seg	Segundos
SEM	Error Estándar de la Media
T.A.	Temperatura ambiente
TACE	Enzima convertidora de TNF- α
TBS	Tris buffer salino
TBST	Tris buffer salino con el agregado de Tween
TGF-β	Factor de crecimiento y transformación-beta
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa
tpo	Tiempo
trat	Tratamiento
ua	Unidades arbitrarias
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
vs	Versus

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1.	Esquema de la estructura de un lobulillo en la glándula mamaria bovina	3
2.	Esquema de la estructura del sistema secretor de la glándula mamaria bovina.	4
3.	A. Esquema que muestra las defensas anatómicas más importantes en la glándula mamaria bovina que actúan como barrera de defensa. B. Defensas celulares y solubles que participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria. Los macrófagos localizados en los alvéolos mamarios fagocitan bacterias localizadas en la cisterna de la glándula. Estos macrófagos activados se relacionan con citoquinas como factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α e (interleuquina-1beta) IL-1 β . C. Las células endoteliales provenientes de vasos sanguíneos adyacentes a los alvéolos expresan moléculas de adhesión en respuesta a citoquinas proinflamatorias, esto, de hecho, facilita el reclutamiento de neutrófilos provenientes del flujo sanguíneo al sitio de infección para eliminar bacterias invasoras.	7
4.	Imagen representativa de la raíz de <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer (Araliaceae) con forma de humano.	29
5.	Perfil del recuento de células somáticas (Log ₁₀ células/ml) del ensayo dosis-respuesta para el EPg (dosis 1, 5 y 10 mg/ml) en relación al periodo de muestreo (hs) (medias \pm SEM). No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos evaluados para los distintos tiempos de análisis ($P_{\text{Tratamiento}}=P_1=0,154$; $P_{\text{tiempo}}=P_t=0,117$).	59
6.	Perfil del recuento de células somáticas (Log ₁₀ células/ml) del ensayo dosis-respuesta para el EPg (dosis 3 mg/ml) en relación al periodo de muestreo (hs) (medias \pm SEM). No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos evaluados para los distintos tiempos de análisis ($P_T=0,471$; $P_t=0,765$).	60
7.	Perfil del recuento de células somáticas (Log ₁₀ células/ml) para cada tratamiento en relación al periodo de muestreo (medias \pm SEM). * Indica diferencias significativas ($P<0,05$).	61
8.	Porcentaje de células inmunomarcadas con PCNA en parénquima y estroma mamario de los distintos tratamientos. Las barras representan las medias de los porcentajes de células inmunomarcadas entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM.	62
9.	Inmunomarcación con PCNA en glándula mamaria bovina a los 7 días del secado. Las flechas indican células PCNA intensamente positivas (+++). A: glándula mamaria inoculada con el EPg; B: glándula mamaria inoculada con placebo; C: glándula mamaria control.	64
10.	Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria inoculada con el EPg a los 7 días del secado. Marcación intensa (3+) del citoplasma de las células epiteliales que tapizan los alvéolos y conductos mamarios. Marcación intensa (3+) del citoplasma de macrófagos (flechas) (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).	65
11.	Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria inoculada con placebo a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).	66
12.	Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria control a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).	67

13. Porcentaje de área inmunomarcada para TNF- α en glándula mamaria bovina para los distintos tratamientos. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM. Diferentes letras denotan diferencias significativas ($P < 0,05$). 68
14. Inmunomarcación para IL-1 α en tejido de glándula mamaria bovina inoculada con el EPg a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B). 69
15. Inmunomarcación para IL-1 α en tejido de glándula mamaria bovina inoculada con placebo a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B). 70
16. Inmunomarcación para IL-1 α en tejido de glándula mamaria bovina control a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B). 71
17. Porcentaje de área inmunomarcada para IL- α en glándula mamaria bovina para los distintos tratamientos. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM. 72
18. Inmunomarcación para IL-6 en tejido de glándula mamaria bovina inoculada con el EPg a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B). 73
19. Inmunomarcación para IL-6 en tejido de glándula mamaria bovina inoculada con placebo a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B). 74
20. Inmunomarcación para IL-6 en tejido de glándula mamaria bovina control a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B). 75
21. Porcentaje de área inmunomarcada para IL-6 en glándula mamaria bovina para los distintos tratamientos. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM. 76
22. Número de monocitos-macrófagos por unidad de área (mm^2) marcados con CD14 en cuartos mamaros bovinos para los distintos tratamientos. Las barras representan las medias del número de monocitos-macrófagos/ mm^2 entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). 77
23. Inmunomarcación de monocitos-macrófagos con CD14 en tejido de glándula mamaria bovina a los 7 días del secado. Las flechas muestran monocitos-macrófagos reactivos al cromógeno utilizado. A: glándula mamaria inoculada con el EPg; B: glándula mamaria inoculada con placebo; C: glándula mamaria control. 78
24. Inmunoblot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ (anti-IL-1 α y anti-IL-6) en glándula mamaria a los 7 días PI. A) IL-1 α - Línea 1: glándula mamaria tratada con EPg; 2: glándula mamaria tratada con placebo; 3: glándula mamaria control. B) IL-6- Línea 1: glándula mamaria tratada con EPg; 2: glándula mamaria tratada con placebo; 3: glándula mamaria control. 79
25. Detección de TNF- α en muestras de leche provenientes de cuartos inoculados con el EPg a lo largo del periodo de muestreo por western blot. Líneas 1: 0 hs pre-inoculación; 2: 24 hs PI; 3: 48 hs PI; 4: 72 hs PI. A la izquierda se indican los pesos moleculares de las 80

bandas detectadas.

26. Análisis representativo de la cuantificación de TNF- α en muestras de leche a lo largo del periodo de muestreo. Las barras representan los valores medios de Densidad Óptica Integrada (DOI) en unidades arbitrarias (ua) \pm SEM. En los animales tratados con el EPg se observaron diferencias significativas en los periodos de 24 (*) y 48 hs (#) ($P_t < 0,001$). 81
27. Detección de TNF- α en muestras de tejido mamario obtenidas a los 7 días del secado. Líneas 1: de animales control; 2: de animales inoculados con el EPg; 3: de animales inoculados con placebo. A la izquierda se indican los pesos moleculares de las bandas detectadas. 81
28. Análisis representativo de la cuantificación de TNF- α en tejido mamario en los distintos grupos estudiados. Las barras representan los valores medios de DOI en unidades arbitrarias (ua) \pm SEM. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). 82
29. Gel de agarosa (2%). Productos de RT-PCR de citoquinas provenientes de muestras de ganglio linfático bovino. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y arriba se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas. 83
30. Optimización del número de ciclos utilizados en los ensayos de PCR para las distintas citoquinas a partir de muestras de leche. Cinética para IL-1 α , IL-1 β , IL-8 y TNF- α . 84
31. Gel de agarosa (2%). Productos de amplificadores de RT-PCR de β -actina provenientes de muestras tratadas con el EPg a distintas horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas. 85
32. Gel de agarosa (2%). Productos de amplificadores de RT-PCR de IL-1 α provenientes de muestras tratadas con el EPg a distintas horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas. 86
33. Semicuantificación del ARNm de IL-1 α en células somáticas de leche proveniente de cuartos mamarios tratados con el EPg y placebo a distintas horas de muestreo. Las barras representan los valores medios de DOI para IL-1 α en relación a β -actina (ua) \pm SEM. 86
34. Gel de agarosa (2%). Productos de amplificadores de RT-PCR de IL-1 β provenientes de muestras tratadas con el EPg a distintas horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas. 87
35. Semicuantificación del ARNm de IL-1 β en células somáticas de leche proveniente de cuartos mamarios tratados con el EPg y placebo a distintas horas de muestreo. Las barras representan los valores medios de DOI para IL-1 β en relación a β -actina (ua) \pm SEM. 88
36. Gel de agarosa (2%). Productos de amplificadores de RT-PCR de IL-8 provenientes de muestras tratadas con el EPg a diferentes horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas. 88
37. Semicuantificación del ARNm de IL-8 en células somáticas de leche proveniente de cuartos mamarios tratados con el EPg y placebo a distintas horas de muestreo. Las barras representan los valores medios de DOI para IL-8 en relación a β -actina (ua) \pm SEM. 89
38. Gel de agarosa (2%). Productos de amplificadores de RT-PCR de TNF- α provenientes de muestras tratadas con el EPg a diferentes horas de muestreo. A la derecha se denotan los 90

pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas.

39. Semicuantificación del ARNm de TNF- α en células somáticas de leche proveniente de cuartos mamarios tratados con el EPg y placebo a distintas horas de muestreo. Las barras representan los valores medios de DOI para TNF- α en relación a β -actina (ua) \pm SEM. 90
40. Inmunomarcación para AE1-AE3 en extendidos de leche con diferente RCS. Células epiteliales con reacción positiva al anticuerpo utilizado (flechas). RCS: 5000 células/ml (A); RCS: 62000 células/ml (B); RCS: 3710000 células/ml (C). 92
41. Gráficos de densidad (izquierda) e histogramas (derecha) que muestran el porcentaje de células positivas para CD14 (región R2 en gráficos de densidad y M1 en histogramas), para cada muestra ensayada. 93
42. Gráficos de densidad (izquierda) e histogramas (derecha) que muestran el porcentaje de células positivas para AE1-AE3 (región R2 en gráficos de densidad y M1 en histogramas), para cada muestra ensayada. 95
43. Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de células AE1-AE3+ (IHQ) vs. el porcentaje de células AE1-AE3+ (CF) ($r = 0,985$; $P < 0,01$). 96
44. Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de LPMN (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,099$; $P = 0,852$). 97
45. Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de LPMN y leucocitos mononucleares (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,351$; $P = 0,496$). 97
46. Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de leucocitos mononucleares (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,644$; $P = 0,167$). 98
47. Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje LPMN (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,986$; $P < 0,01$). 99
48. Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de LPMN y leucocitos mononucleares (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,992$; $P < 0,01$). 99
49. Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de leucocitos mononucleares (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,666$; $P = 0,334$). 100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.	Pág.
1. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, diluciones de uso, tipo de recuperación antigénica empleada, modo de incubación del anticuerpo primario y procedencia del mismo.	42
2. Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324. BIO-RAD.	46
3. Anticuerpos utilizados en la técnica de western blot.	47
4. Lista de cebadores utilizados como genes normalizadores y condiciones óptimas de trabajo.	49
5. Cebadores utilizados para la detección de citoquinas bovinas en células somáticas de leche y ganglio linfático bovino. Condiciones óptimas de trabajo.	50
6. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, diluciones de uso, modo de incubación del anticuerpo primario y procedencia del mismo.	56
7. Porcentajes de células inmunomarcadas y coloreadas con coloración de contraste en extendidos de leche. Valores absolutos/ml hallados en relación al RCS. A: Valores obtenidos de células epiteliales inmunomarcadas. B: Valores obtenidos de LPMN. C: Valores obtenidos de leucocitos mononucleares.	91
8. Porcentajes de células positivas (monocitos-macrófagos) y valores absolutos/ml hallados en relación al RCS por CF en muestras de leche para el antígeno de superficie (CD14+).	94
9. Porcentajes de células positivas y valores absolutos/ml hallados en relación al RCS por CF en muestras de leche para el antígeno intracelular estudiado (AE1-AE3+).	96

RESUMEN

La glándula mamaria bovina es altamente susceptible a nuevas infecciones intramamarias (IIM) durante el periodo de involución temprana y periparto; estando el control clásico de estas IIM basado en el uso de antibióticos intramamarios. La búsqueda de estrategias alternativas con el objetivo de mejorar el sistema inmune de la glándula mamaria bovina durante este periodo podría favorecer la capacidad del animal para resistir a nuevas infecciones y evitar el uso de antibióticos cuyos residuos causan efectos perjudiciales tanto para la salud como para los procesos industriales.

La inmunomodulación es definida como la modificación de la respuesta inmune por medio de la administración de sustancias que poseen la capacidad de regular el sistema inmune. Los modificadores de la respuesta biológica ó MRB son agentes que modifican la respuesta frente a organismos patógenos resultando en efectos profilácticos o terapéuticos beneficiosos para el hospedador. En este sentido, el ginseng, es la raíz de *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae), y se ha reportado que sus extractos tienen efectos moduladores sobre células fagocíticas, linfocitos y sobre la producción de anticuerpos tanto en humanos como en animales.

El objetivo del presente trabajo consistió en describir los efectos inmunomoduladores de una infusión intramamaria de *Panax ginseng* (*P. ginseng*) como MRB analizando parámetros de la inmunidad innata en glándula mamaria bovina al final de la lactancia.

En el presente estudio se utilizaron 6 vacas no preñadas al final de la lactancia. La unidad experimental fue el cuarto mamario. Ocho cuartos mamarios fueron inoculados con 10 ml de extracto de *Panax ginseng* (EPg) (3 mg/ml), 8 cuartos fueron tratados con 10 ml de placebo (vehículo sin principio activo) y 8 cuartos fueron mantenidos como control (libres de inoculación). El ordeño fue interrumpido inmediatamente después de las inoculaciones.

La proliferación celular en los distintos cuartos mamarios inoculados fue evaluada mediante la expresión de PCNA por Inmunohistoquímica (IHQ). Además, la marcación y cuantificación de la expresión de citoquinas (TNF- α , IL-1 α , IL-6) en tejido mamario se realizó por IHQ mediante anticuerpos específicos, cuya especificidad fue corroborada mediante western blot. La cuantificación de monocitos-macrófagos en los cuartos mamarios estudiados fue llevada a cabo también mediante la técnica de IHQ. Por otra parte, muestras de leche fueron colectadas de manera aséptica a distintos tiempos para la detección de ARNm de citoquinas mediante técnicas de RT-PCR y western blot.

El RCS arrojó las mayores diferencias significativas a las 24, 48 y 72 hs post-inoculación (PI) en todos los cuartos tratados con el EPg comparado a los cuartos tratados con placebo y cuartos no inoculados (controles).

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de proliferación de las células epiteliales y estromales mamarias entre los tres grupos evaluados, determinando que el tratamiento con EPg no afectaría al periodo de involución evaluado en el presente trabajo.

El área inmunomarcada para TNF- α fue significativamente mayor en cuartos tratados con el EPg comparado a cuartos con placebo y cuartos controles.

El análisis de los porcentajes de áreas inmunohistoquímicamente marcadas para las citoquinas IL-1 α e IL-6 en los diferentes tratamientos evaluados, no mostró diferencias significativas, aunque si se observó un leve aumento de la expresión de estas citoquinas en cuartos inoculados con EPg comparado con los grupos placebo y controles.

El tratamiento con EPg en cuartos libres de IIM mostró un incremento significativo en el número de monocitos-macrófagos durante el período de involución evaluado con respecto a cuartos tratados con placebo y a cuartos controles.

Además, se evaluó la producción de TNF- α en secreción mamaria y tejido mamario por western blot. Para el análisis en secreción mamaria, no se detectó la proteína en muestras de placebo. Sin embargo, en cuartos tratados con el EPg se encontraron dos bandas de 17 y 26 kDa a las 24 y 48 hs PI. Además, se observó un incremento significativo en los niveles de la proteína soluble de 17 kDa de TNF- α a las 24 y 48 hs PI en cuartos tratados con EPg comparado con los restantes periodos evaluados. En tejido mamario, en condiciones reductoras, se encontró una banda de 26 kDa (proteína de membrana) y una banda de 17 kDa (proteína soluble) en los tres grupos evaluados. Se observaron diferencias significativas en la banda de 26 kDa en cuartos tratados con el EPg comparado con los otros grupos evaluados. Por otra parte, para el análisis de la banda de 17 kDa, si bien, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos evaluados, hubo una tendencia en aumento de la expresión de TNF- α en tejido mamario en muestras tratadas con EPg.

Mediante RT-PCR se detectaron ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) de IL-1 α , IL-1 β , IL-8 y TNF- α en células somáticas provenientes de leche de cuartos tratados con EPg y placebo, en contraste, no se detectaron los ARNm de IL-2, IL-4, IL-6 e INF- γ . Se observó un incremento significativo en la expresión de ARNm de IL-1 α , IL-1 β y

TNF- α en cuartos tratados con EPg a las 48 hs PI comparado a cuartos tratados con placebo.

Si bien, la dosis de EPg aplicada en el presente trabajo estimuló la expresión de ARNm de IL-8 en células extraídas de la leche a las 24 y 48 hs PI, no se observaron diferencias significativas entre los tratados con EPg como con placebo en cualquiera de los tiempos de ensayo evaluados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio y su discusión con los aportes de otros autores, permiten llegar a las siguientes conclusiones: la inoculación con el EPg en el secado se asoció con el incremento de células somáticas, con la estimulación del influjo y el reclutamiento de monocitos-macrófagos, con la presencia de la proteína TNF- α en leche y tejido mamario, y con la transcripción de ARNm de citoquinas proinflamatorias. Finalmente, se observó que el extracto aquí aplicado (*P. ginseng*) puede ejercer efectos inmunomodulatorios en glándula mamaria bovina y, por lo tanto, podría jugar un papel importante en la activación de las defensas intramamarias para el control de mastitis al momento del secado, ya sea usándolo solo o en combinación con la terapia antibiótica.

Como complemento a este trabajo de tesis, se desarrolló un método de conteo celular directo como herramienta para la identificación de células somáticas en leche bovina para generar una técnica alternativa a la citometría de flujo (CF). Se utilizaron muestras de leche con diferentes RCS a partir de las cuáles se realizaron extendidos celulares los que se sometieron a IHQ para la detección de diferentes tipos celulares y a CF. Los análisis de correlación entre ambas técnicas demostraron que la técnica de identificación por método directo podría ser útil como alternativa a la CF para muestras con bajos RCS.

ABSTRACT

The bovine mammary gland is highly susceptible to new intramammary infections (IMIs) during early involution and the periparturient period. Classic control of IMI at drying off is based on intramammary antibiotic infusion. Alternative strategies aimed at enhancing the mammary gland immune system during this period could enhance the animal's ability to resist new IMI and avoid the use of antibiotics, whose residues cause harmful effects to both health and industrial processes.

Immunomodulation is defined as the modification of the immune response by means of the administration of substances that possess the ability to regulate the immune system. Biological response modifiers (BRM) are agents that modify the host's response to pathogens with resultant beneficial prophylactic or therapeutic effects. In this sense, ginseng is the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae) and its extract has been reported to have modulatory effects on phagocytic cells, lymphocytes and antibody production in both humans and animals.

The purpose of the present study was to describe the immunomodulatory effects of a single intramammary infusion of *Panax ginseng* (*P. ginseng*) as a MRB, analyzing parameters of innate immunity on bovine mammary glands at the end of lactation.

Six nonpregnant cows in late lactation were used in the present study. Unit of study was the mammary quarter. Eight mammary quarters were infused with 10 ml of *Panax ginseng* extract (PgE) (3 mg/ml), eight quarters were treated with 10 mL of placebo (vehicle alone) and eight quarters were maintained as uninoculated controls. Milking was interrupted after infusion.

Cellular proliferation in inoculated mammary quarters was evaluated by the expression of PCNA by immunohistochemistry (IHC). In addition, staining and quantification of the expression of cytokines (TNF- α , IL-1 α , IL-6) in udder tissue was performed by IHC using specific antibodies, whose specificity was confirmed by western blot. The quantification of monocytes-macrophages cells in mammary quarters was carried out to using IHC technique. On the other hand, milk samples were aseptically collected at different times for performing SCC (somatic cell count), detection of specific cytokines mRNA by RT-PCR and western blotting assay.

Milk SCC were significantly increased at 24 h, 48 h and 72 h post-inoculation (PI) in all PgE-treated quarters compared with placebo and uninoculated control quarters.

No significant differences were found in the proliferation percentage in mammary epithelial and stromal cells among the three groups, which determined that treatment

with PgE would not interfere with cellular proliferation at the involution period evaluated in this study.

The immunostaining area for TNF- α was significantly higher in PgE quarters compared with with placebo and control quarters.

The analysis of the percentages of immunohistochemical stained areas for the cytokines IL-1 α and IL-6 for the different treatments, showed no significant differences, although there was a slight increase in the expression of these cytokines in the PgE-quarters compared with placebo and controls groups.

PgE treatment in IMI-free quarters showed a significant increase in the number of monocytes-macrophages during the involution period, compared with placebo and control quarters.

Further, the production of TNF- α in mammary secretions and mammary tissues was evaluated by western blot. For the analysis in mammary secretion, this protein was not detected in any placebo samples. However, two bands of 17 and a 26 kDa were observed at 24 and 48 PI in PgE-treated quarters. Moreover, a significant increase in the levels of soluble 17 kDa TNF- α was observed in PgE-treated quarters at 24 and 48 h PI compared with other periods of the study. In mammary tissue, in reduced condition, a 26-kDa band (membrane-bound) and a band of soluble 17-kDa form in the three evaluated groups was found. A significant increase of 26 kDa TNF- α level was observed in PgE-treated quarters compared with other evaluated groups. On the other hand, for the analysis of the band of soluble 17 kDa, although there were no significant differences among the three evaluated groups, an increased expression of TNF- α in mammary tissue samples treated with PgE was observed.

IL-1 α , IL-1 β , IL-8 and TNF- α mRNA were detected in milk somatic cells in PgE and placebo quarters by RT-PCR, in contrast IL-2, IL-4, IL-6 and INF- γ mRNA were not found. A significant increase of IL-1 α , IL-1 β and TNF- α mRNA expression was observed in PgE-treated quarters compared with placebo-treated quarters at 48 h PI.

Although, the dose of PgE applied in the present study stimulated the expression of IL-8 mRNA in milk cells extracted at 24 and 48 h PI, no significant differences were observed among PgE-treated and placebo-treated at any experimental time point.

The results obtained in this study and its discussion with input from others authors allowed to elaborate the following conclusions: PgE inoculation at drying off was associated with somatic cells increase, stimulation of the influx and recruitment of

monocytes- macrophages, with the presence of protein TNF- α in milk and mammary tissue, as well as proinflammatory cytokines mRNA transcription. Finally, was observed that the extract here applied (*P.ginseng*) can exert immunomodulating effects in bovine mammary gland and could therefore play a role in mastitis control at drying off enhancing intramammary defenses, either alone or in conjunction with dry cow antibiotic therapy.

In addition to this work, a direct cell count method was carried out as a tool for the identification of bovine milk somatic cells to generate as alternative technique to flow cytometry. Milk samples with different SCC were used, from which cellular smears were made. These were subjected to IHC for the detection of different cellular types and to flow cytometry. Correlation analysis between both techniques showed that the technique of identification by the direct method could be useful for samples with low SCC, and can therefore be an alternative to flow cytometry for these kinds of samples.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Histología de la glándula mamaria bovina

La glándula mamaria bovina es una glándula túbulo-alveolar compuesta, de origen cutáneo. Su desarrollo comienza en el embrión y continúa lentamente durante el periodo prepubertal. Cada glándula consiste en un epitelio secretor rodeado por un estroma de tejido conectivo subcutáneo con mayor o menor abundancia de tejido adiposo, dependiendo del estadio de lactancia en que se encuentre el animal. Los conductos colectores de la glándula desembocan en la superficie de la piel por medio del pezón (Dellmann, 1994).

El sistema colector consiste en conductos ramificados que terminan en conductillos de secreción y, cuando la glándula se encuentra en actividad, en alvéolos. El conjunto de alvéolos conforman un lobulillo, cada alvéolo se separa de sus vecinos por medio de tejido conectivo intralobulillar, y los lobulillos dentro del tejido conectivo forman lóbulos, los cuales están limitados por tejido conectivo interlobulillar. Cada alvéolo está revestido por una capa de epitelio cúbico simple en el estadio no secretor o de reposo. Células mioepiteliales contráctiles que presentan numerosas prolongaciones, rodean el epitelio de los conductos y los alvéolos, y una membrana basal continua encierra todo el sistema epitelial. Durante la lactación, cuando la glándula se halla activa, los alvéolos y conductos secretores presentan un epitelio simple con células cilíndricas o columnares también llamadas lactocitos y la secreción se hace histológicamente visible en forma de vesículas y gotas lipídicas en el citoplasma de las mismas y en la luz de los conductos (figura 1).

El tejido intersticial (estroma) de la glándula mamaria proporciona importante sostén estructural para las unidades secretoras y contiene vasos sanguíneos y linfáticos, y nervios. Rodeando a cada unidad secretora (parénquima) hay una capa de tejido conjuntivo laxo con un extenso plexo de capilares sanguíneos y linfáticos. Son constituyentes frecuentes las células plasmáticas y linfocitos, particularmente en el momento del parto, cuando se segrega el calostro. El tejido conjuntivo que rodea cada lobulillo es grueso, y contiene conductos interlobulillares, vasos sanguíneos y linfáticos mayores (Dellmann, 1994).

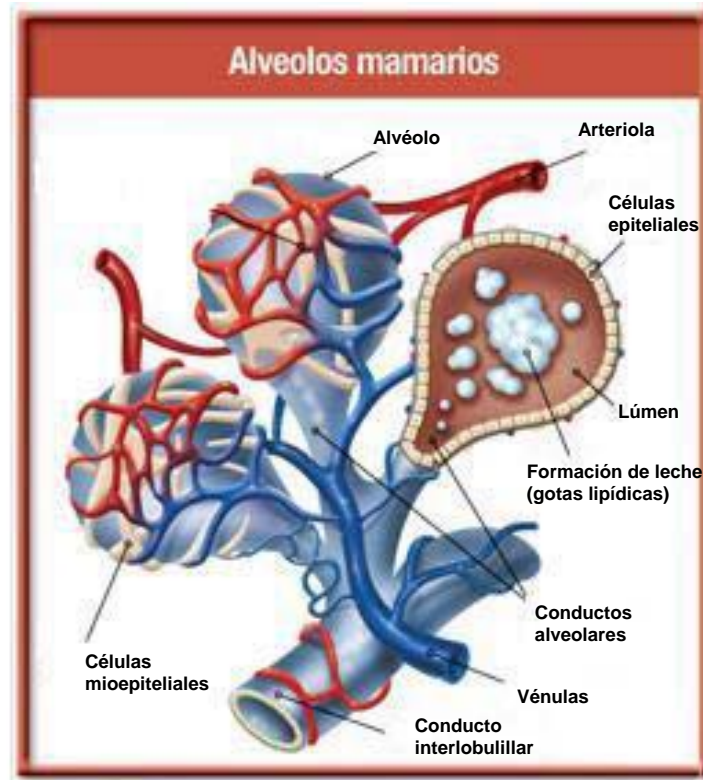


Figura 1: Esquema de la estructura de un lobulillo en la glándula mamaria bovina (SERVET, Grupo Asis Biomedica, S.L. (<http://www.servet.es/posteres.php?pg=pt>)).

Numerosos conductos interlobulillares drenan en un conducto lobular o galactóforo que es el único conducto excretor del lóbulo. Varios conductos galactóforos o lobulares drenan en un seno o cisterna glandular, seno lactífero o seno galactóforo. Cada cisterna glandular está ubicada en la base de cada pezón. La cisterna glandular es la encargada de almacenar leche en los intervalos entre succiones. La parte final del sistema de los conductos termina en el canal papilar del pezón. Desde la cisterna glandular emerge un conducto ensanchado, que atraviesa longitudinalmente al pezón, denominado seno o cisterna de pezón. Entre la cisterna glandular y la cisterna del pezón se encuentra un pliegue anular de mucosa que actúa como un esfínter interno. Al contraerse las fibras musculares del esfínter hacen que la luz del conducto sea estrellada, debido a los pliegues longitudinales que se forman. En proximal al canal del pezón se encuentra una estructura formada por una papila de tejido conectivo recubierta por epitelio, denominada “roseta de Fürstenberg”. La leche secretada por los lactocitos es drenada a través de los espacios alveolares, conductos intralobulillares, conductos colectores

centrales, conductos galactóforos, cisterna glandular, cisterna del pezón, canal papilar y finalmente a través del orificio del pezón hacia el exterior (figura 2).

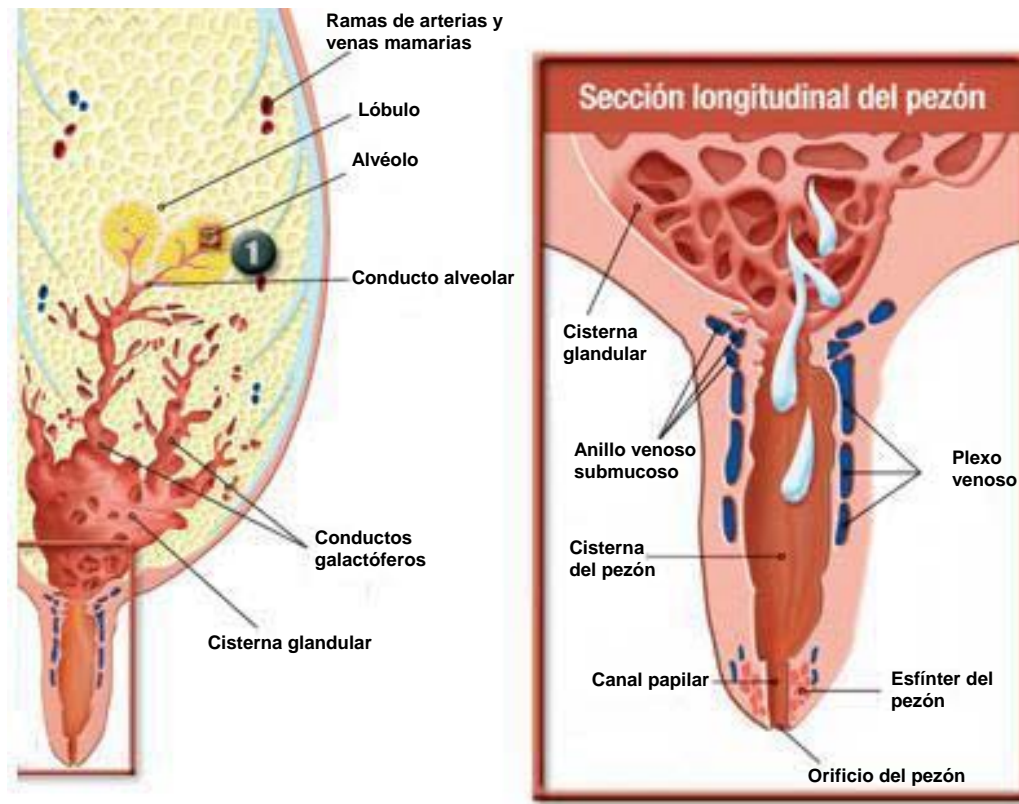


Figura 2: Esquema de la estructura del sistema secretor de la glándula mamaria bovina. (SERVET, Grupo Asis Biomedica, S.L. (<http://www.servet.es/posteres.php?pg=pt>)).

1.2. Inmunidad de la glándula mamaria

La inmunidad de la glándula mamaria, definida como la protección y resistencia a enfermedades infecciosas, es proporcionada a través de una variedad de factores inmunes y no inmunes. La respuesta inmune es caracterizada por la habilidad de reconocer y discriminar entre las moléculas propias del organismo de las no propias. Esta respuesta puede ser dividida en dos categorías distintas: la inmunidad innata ó inespecífica y la inmunidad adaptativa ó específica (Sordillo y Streicher, 2002). Las principales diferencias entre ambas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico.

En la inmunidad innata, los receptores celulares reconocen estructuras altamente conservadas presentes en un gran grupo de microorganismos (Medzhitov y Janeway,

2000a). Estas estructuras son designadas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores involucrados en identificarlas son llamados receptores para reconocimiento del patrón (RRP) (Medzhitov y Janeway, 2000b). Otra diferencia característica de la inmunidad innata con respecto a la adaptativa es que ésta se activa rápidamente frente al encuentro con un patógeno dado, en el sitio de infección por diversos estímulos, y no se ve aumentada frente a repetidas exposiciones al mismo patógeno; es decir, que la inmunidad innata no tiene memoria inmunológica, mientras que la eficiencia de la inmunidad adaptativa reside en la memoria (Rainard y Riollet, 2006).

En la glándula mamaria bovina, la inmunidad innata predomina en la etapa temprana de infección y es mediada por macrófagos, neutrófilos, células *Natural Killer* (NK) y citoquinas. En general, las bacterias poseen diferencias estructurales en sus paredes celulares, que son reconocidos por receptores específicos de membrana. Entre estas estructuras se encuentran lipopolisacáridos (LPS), péptidoglicanos (PGN) y ácido lipoteicoico (ALT), los cuáles constituyen los PAMPs (Bannerman y col., 2004b; Han y col., 2003). Estos últimos son reconocidos por los receptores de “Tipo Toll”, los *Toll like receptor* (TLRs), los cuáles se encuentran localizados en las membranas celulares y endosomales de las células inmunes (Rosenberger y Finlay, 2003), y proveen la señalización celular durante la iniciación de la respuesta inmunitaria (Janeway y col., 2001). La interacción entre PAMPs y TLRs produce la síntesis de citoquinas y otros mediadores endógenos que son esenciales en la protección contra microorganismos patógenos.

Si el patógeno es capaz de evadir el sistema de defensa innato o no es completamente eliminado por el mismo, el sistema inmune adquirido se activa de manera consecutiva. Este sistema reconoce determinantes antigénicos específicos del patógeno. Si el huésped encuentra más de una vez al mismo antígeno puede ocurrir, un elevado estado de inmuno-reactividad como consecuencia de la memoria inmunológica. En comparación a la primera exposición con el antígeno bacteriano, la “respuesta de memoria” puede ser más rápida, fuerte, duradera y a veces más efectiva en lo que a la eliminación del patógeno se trata (Sordillo y Streicher, 2002).

1.2.1. Defensas residentes de la glándula mamaria

Ante la llegada de microorganismos patógenos a la glándula mamaria, existen ciertas barreras residentes que protegen al huésped en cuanto ingresa el microorganismo. Un resumen de las barreras residentes se encuentra graficado en la figura 3.

1.2.1.1. Barreras anatómicas

El canal del pezón, es la principal puerta de entrada a la glándula de numerosos microorganismos causantes de mastitis (Sandholm y Korhonen, 1995), y junto con la piel, es considerado como la primera barrera de defensa contra patógenos. La condición de la piel de la glándula mamaria es de vital importancia. Cuando la piel se encuentra sana la mayoría de los patógenos tiene limitadas posibilidades de sobrevivir (King, 1981) y se reduce el riesgo de colonización de bacterias como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

El diámetro del pezón y en menor medida la longitud del mismo, tienen una relación directa con la incidencia de enfermedades intramamarias. A mayor diámetro, mayor tasa de nuevas infecciones intramamarias (IIM). Estudios morfométricos indican que el diámetro del canal del pezón cambia considerablemente durante el periodo seco ó de involución, periodo durante el cual la glándula se prepara para la próxima lactancia, y también durante el periodo de lactancia (NMC, 1996). Este diámetro fue mucho mayor a los 7 días del secado comparado con los días 1, 16 y 30, hallándose una relación positiva entre diámetro e incidencia de enfermedades intramamarias (Nickerson, 1989).

A medida que el proceso de involución de la glándula mamaria progresa, ésta se torna más resistente a las IIM. Dicha resistencia, entre otras causas, fue atribuida a la formación del tapón de queratina en el conducto del pezón, el cual previene el ascenso y la multiplicación bacteriana en la glándula. Además, los ácidos grasos que forman parte de la queratina, como el ácido mirístico, palmitoleico y linoleico, tienen características bacteriostáticas (Treece y col., 1966), lo que evita la radicación de microorganismos infecciosos. Por el contrario, durante la lactancia, después de que la vaca ha sido ordeñada, el canal permanece abierto por aproximadamente dos horas, favoreciendo el

ingreso de microorganismos patógenos (Sandholm y Korhonen, 1995; Corbellini, 1998).

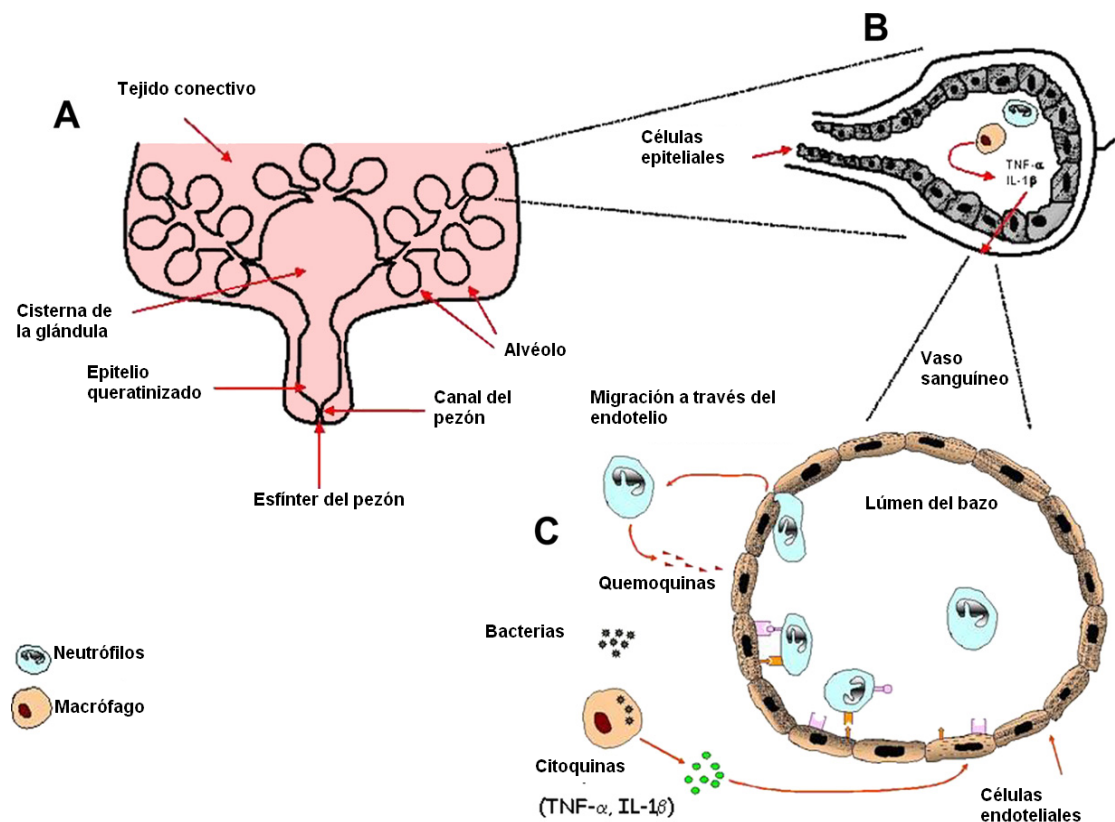


Figura 3: A. Esquema que muestra las defensas anatómicas más importantes en la glándula mamaria bovina que actúan como barrera. B. Defensas celulares y solubles que participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria. Los macrófagos localizados en los alvéolos mamarios fagocitan bacterias localizadas en la cisterna de la glándula. Estos macrófagos activados se relacionan con citoquinas como factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α e interleuquina-1beta (IL-1 β). C. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos adyacentes a los alvéolos expresan moléculas de adhesión en respuesta a citoquinas proinflamatorias, esto, de hecho, facilita el reclutamiento de neutrófilos provenientes del flujo sanguíneo al sitio de infección para eliminar bacterias invasoras (Oviedo-Boyso y col., 2007).

1.2.1.2. Defensas celulares

Si las bacterias sobrepasan las defensas del canal del pezón, deberán enfrentarse a un ejército de diferentes leucocitos de distintas clases capaces de iniciar la inmunidad innata ó la específica.

Los macrófagos son las células predominantes en la leche normal y constituyen entre el 30 y 75 % del total de la población celular en leche de cuartos mamarios sanos

(Östensson y col., 1988). Estas células se parecen estructuralmente a su precursor, el monocito sanguíneo (Duffield, 2003). Los monocitos son células circulantes que migran hacia los tejidos donde se diferencian a macrófagos inflamatorios.

En la defensa contra infecciones bacterianas, los macrófagos presentes en la leche y en el tejido mamario, reconocen al patógeno e inician la respuesta inflamatoria. Son importantes agentes de defensa, ya que participan en la eliminación de restos celulares, células muertas, material intracelular dañado, bacterias, partículas inertes y cuerpos extraños. La velocidad fagocítica de los macrófagos puede incrementarse substancialmente en presencia de anticuerpos que median la opsonización de patógenos específicos (Sordillo y col., 1997).

Además de su rol en la defensa innata temprana, los macrófagos juegan un rol importante en el procesamiento y presentación antigénica (Fitzpatrick y col., 1992; Politis y col., 1992). Los antígenos de bacterias internalizadas son procesados por los macrófagos y luego se localizan en su membrana celular en asociación a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II. Estas últimas, son moléculas de membrana polimórficas las cuáles son requeridas por las células del huésped (linfocitos) para el reconocimiento de antígenos externos (Fainboim y Geffner, 2008).

Al comienzo de la inflamación, los macrófagos secretan gran cantidad de sustancias como prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas que participan en la inflamación, facilitando la migración y la actividad bactericida de los neutrófilos (Baumann y Gauldie, 1994). Las endotoxinas, tales como LPS, estimulan la producción de interleuquinas por parte de los macrófagos y otras células. Las citoquinas, IL-1 y TNF- α , promueven la expresión de moléculas de superficie tales como ICAM (moléculas de adhesión intercelular) y selectinas sobre células endoteliales, para contribuir a la acumulación de leucocitos en sitios locales de inflamación (Oviedo-Boyso y col., 2007).

Los neutrófilos son el tipo de células predominantes durante la inflamación temprana en el tejido mamario y sus secreciones, y pueden constituir un porcentaje mayor al 90% del total de los leucocitos en la glándula mamaria (Paape y col., 1981; Sordillo y col., 1987; Sordillo y col., 1989). En leche normal, gran parte de estos son no viables ó están en proceso de apoptosis, sobre todo los que se encuentran en la cisterna de la glándula. Estas células de la inmunidad inespecífica viajan desde la sangre a la

glándula mamaria en respuesta a las sustancias secretadas por los macrófagos. Esta migración desde la sangre puede verse comprometida debido a la disminución de la proporción de células que expresan el receptor de adhesión CD62L (L-selectina) el cuál es necesario para la penetración de los neutrófilos desde el endotelio al sitio de infección (Lee y Kehrly, 1998).

Una vez en el sitio de infección, los neutrófilos fagocitan y eliminan a las bacterias ejerciendo sus efectos bacteriostáticos a través de su capacidad bactericida, dada por mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. El mecanismo independiente de oxígeno está compuesto por enzimas lisosomales, tales como la lisozima y la perforina, mientras que los mecanismos dependientes de oxígeno, básicamente, están dados por la generación de radicales oxígeno libre. Una vez iniciado el proceso de fagocitosis, los neutrófilos generan aniones superóxido y peróxido de hidrógeno, los cuales actúan como sustrato para la formación de productos tóxicos (Babior, 1984). En una etapa posterior, con la formación del fagolisosoma, como consecuencia de la fusión entre el lisosoma y el fagosoma, se genera mieloperoxidasa, catalizando ésta la formación de hipoclorito y otros agentes oxidantes, de elevada efectividad bactericida (Paape y col., 1991; Tizard, 1996). Además, durante la fagocitosis, las bacterias pueden ser expuestas a varias enzimas como la peroxidasa, enzimas hidrolíticas y la lactoferrina.

Paape y col. (1996), demostraron que los neutrófilos bovinos poseen la capacidad de unirse a anticuerpos monoclonales anti CD14 y CD18 humanos, indicando que los CD14 y 18 en neutrófilos humanos y bovinos comparten un determinante antigénico común. Estos receptores celulares de superficie en leucocitos han sido identificados como cruciales para el control de las infecciones por bacterias Gram (-) (Anderson y Springer, 1987; Maliszewski y Wright, 1990). El receptor de CD14 es una proteína de 53 kDa que está presente en monocitos y macrófagos humanos y en menor medida en neutrófilos (Landmann y col., 1991). Esta proteína anclada en la membrana facilita el *clearance* de LPS bacterianos previniendo el shock séptico inducido por éste (Lee y col., 2003), además produce una señal de activación en las células epiteliales mamarias para que expresen IL-8 (Wang y col., 2002).

Sumado a sus capacidades fagocíticas, estos tipos celulares de la defensa inmune innata, los neutrófilos, son una fuente de péptidos antibacterianos (defensinas), las cuáles son capaz de eliminar a un gran número de patógenos causantes de mastitis (Selsted y col., 1993).

Las células NK son linfocitos de gran tamaño y de forma granular que poseen actividades citotóxicas independientes del CMH, utilizando sus receptores Fc para participar en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Las células NK se unen a células tumorales o infectadas con virus y al degranularse secretan perforinas que destruyen la célula blanco por disrupción de la membrana celular.

Si bien los neutrófilos y macrófagos están muy bien preparados para encontrar y eliminar los patógenos extracelulares, las células NK son críticas al momento de eliminar patógenos intracelulares (Rainard y Riollet, 2006). Además, las células NK también son capaces de matar bacterias Gram (-) y (+) lo que les confiere importancia en la prevención de las IIM (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996).

Entre las células presentadoras de antígenos se destacan las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. Las células dendríticas son consideradas células profesionales en el procesamiento y presentación antigénica. Se encuentran distribuidas por todo el organismo, en especial debajo de las superficies mucosas, teniendo en cuenta que más del 90% de las infecciones ocurren por esta vía. De acuerdo a la naturaleza del antígeno y dependiendo del momento fisiológico que se encuentra el animal presentarán el antígeno en combinación con el CMH-I o en unión al CMH-II. Si toma el primer camino (CMH-I) predominará la respuesta inmunitaria de base celular con secreción de citoquinas (IL-2, IL-12 e IFN- γ) y los linfocitos T CD8+ citotóxicos. Por el contrario, si la partícula antigénica es presentada en combinación con el CMH-II, predominará la secreción de IL-4, IL-5 e IL-6, con proliferación de linfocitos B, producción de inmunoglobulinas y respuesta inmunitaria de base humoral (Hope y col., 2003).

Los linfocitos son los encargados de construir y regular la respuesta inmunitaria y son las únicas células que reconocen antígenos a través de receptores específicos de membrana (Sordillo y col., 1997). Existen dos clases distintas de linfocitos, los cuáles difieren en su función y productos de secreción: linfocitos T y B.

Los linfocitos T reconocen los componentes antigénicos a través de receptores de membrana y son los responsables de la regulación y efectividad de la respuesta inmunitaria (Janeway y col., 2001). Del total de linfocitos sanguíneos, la subpoblación de células T es la predominante en los rumiantes, llegando a representar hasta un 80% del total (Tizard, 2000).

Los linfocitos T pueden ser divididos en dos grandes poblaciones, dependiendo de la expresión de marcadores de superficie y del tipo de citoquina secretada: los linfocitos $\alpha\beta$, los cuales a su vez pueden ser subdivididos en T helper o colaboradores (CD4+) y T citotóxicos/supresores (CD8+), y los linfocitos $\gamma\delta$. El predominio de alguna de estas subpoblaciones dependerá de factores disímiles tales como estado productivo del animal o características del substrato antigénico, pudiéndose así afectar la implementación de una adecuada respuesta inmunitaria y por consiguiente la salud general del animal (Meglia, 2007).

Comparadas con otras especies, como los seres humanos y los ratones, el sistema inmunitario de los rumiantes contiene una gran proporción de linfocitos T $\gamma\delta$. El número de dichas células varía de acuerdo a la edad del animal, con un número considerablemente mayor en animales jóvenes en relación con los adultos (Hein y Mackay, 1991).

En el tejido glandular mamario de animales sanos, se encuentran a los linfocitos T CD4+ en la porción interalveolar, y a los linfocitos T CD8+ principalmente rodeando a los alvéolos (Leitner y col., 2003). Durante la mastitis, prevalecen los linfocitos T CD4+ y son activados en respuesta al reconocimiento de antígenos del CMH clase II y las células presentadoras de antígenos, como linfocitos B y macrófagos, produciendo en respuesta ciertas citoquinas y la activación de la respuesta inmunitaria celular y humoral (Sordillo y col., 1997; Kimura y col., 1999). Dependiendo del repertorio de citoquinas producidas, la respuesta de las células T helper puede facilitar tanto la respuesta inmune mediada por células (tipo Th1) o la respuesta inmune humoral (tipo Th2) (Brown y col., 1998).

El principal rol de los linfocitos B es el de producir anticuerpos contra patógenos invasores. A diferencia de los macrófagos y neutrófilos, los linfocitos B utilizan los receptores de membrana para reconocer antígenos específicos (Sordillo y col., 1997). De manera similar a los macrófagos y células dendríticas, estos linfocitos pueden funcionar como células presentadoras de antígenos. Los linfocitos B internalizan, procesan y presentan el antígeno en el contexto del CMH clase II para linfocitos T helper. Después de la presentación del antígeno procesado, los linfocitos T secretan IL-2, la cual induce a su vez proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas que producen anticuerpos y células de memoria. A diferencia de los

linfocitos T, los linfocitos B, permanecen constantes durante la lactancia (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996).

1.2.1.3. Defensas solubles

Existen factores solubles específicos y no específicos que representan una importante línea de defensa dentro de la glándula mamaria bovina. Estos factores pueden despertar una respuesta efectiva protectora contra la invasión de patógenos.

Los primeros efectores solubles de la respuesta inmune específica son los anticuerpos producidos por linfocitos B activados por antígenos. Existen cuatro clases de inmunoglobulinas (Ig) conocidas, que influyen en los mecanismos de defensa antibacterianos en la glándula mamaria: IgG1, IgG2, IgA e IgM (Guidry y Miller, 1986). En general las Ig alcanzan su pico de concentración máximo en secreciones mamarias durante la calostrogénesis e inflamación. IgG1 es el isotipo primario encontrado en secreción mamaria saludable, pero IgG2, aumenta sustancialmente durante la inflamación de la glándula mamaria. Algunos isotipos pueden actuar como opsoninas (IgG1, IgG2 e IgM) aumentando la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos. Por el contrario, IgA no participa en la opsonización bacteriana, pero tiene funciones en la aglutinación de bacterias invasoras que pueden extenderse y causar infecciones bacterianas en la glándula mamaria.

La glándula mamaria, además, contiene factores bacteriostáticos no específicos los cuales pueden actuar en asociación o no con las inmunoglobulinas. Uno de estos factores es la proteína lactoferrina (LF), la cual es producida por leucocitos y células epiteliales. Esta proteína es capaz de fijar iones hierro (Fe) proveniente de la leche, haciéndolos así inaccesible a las bacterias que necesitan a este metal como un factor para su crecimiento, como *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (Sordillo y Streicher 2002). Su efecto es menor en bacterias de escasas necesidades de Fe, como los Estreptococos (Sandholm y Korhonen, 1995). Como contrapartida, el citrato compite por el Fe con la LF, quedando éste bajo una forma disponible para uso bacteriano (Oliver y Sordillo, 1989). A medida que avanza el proceso involutivo de la glándula mamaria, las concentraciones de citrato disminuyen mientras que la LF se incrementa. Por el contrario, durante la lactancia la efectividad bacteriostática de la LF es reducida, debido a que su contenido en leche es bajo y el de

citrato muy elevado. La LF también ejerce cierta actividad inmunomoduladora, con capacidad opsonizante, incrementando la capacidad fagocítica y destructora de los neutrófilos (Tizard, 1996). Esta proteína también posee actividad bactericida, particularmente en los fragmentos N-terminales (lactoferricina), ejerciendo su actividad por disrupción de la pared celular (Orsi, 2004).

La LF además, es capaz de operar sinérgicamente con otros componentes de defensa, como el complemento ó la lisozima. La LF bovina modula la activación del complemento y la unión de esta proteína a *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) activa la vía clásica del complemento, resultando en la opsonización de la bacteria. (Rainard, 1993).

Además de la LF, la transferrina es otra proteína que une Fe, y que está presente en la leche. La leche de los ruminantes contiene solo bajas concentraciones de esta proteína, desde 1 mg/ml en calostro hasta 0,02-0,04 mg/ml en leche comparado a 4-5 mg/ml en suero (Rainard y col., 1982, Sánchez y col., 1988). En bovinos, la transferrina no se sintetiza en la glándula mamaria, sino que proviene del suero sanguíneo y llega hacia la glándula mediante transcitosis en procesos infecciosos. Por el contrario esta proteína se encuentra en altas proporciones en roedores y conejos, la cual es producida en la misma glándula mamaria en estas especies (Ollivier-Bousquet, 1998).

Otro componente soluble presente en la glándula mamaria es la lisozima. Esta, es una proteína que cliva los PGN de la pared celular de las bacterias Gram (-) y (+), aunque solo unas pocas especies de bacterias son lisadas por la lisozima. La leche bovina contiene un promedio de 13 µg/100 ml, comparado a los 10 mg/100 ml presentes en la leche humana (Reiter, 1985). Por ello, si bien esta proteína está presente, no es considerada una defensa importante en la glándula mamaria bovina.

La lactoperoxidasa es una enzima que, en presencia de tiocianato y peróxido de hidrógeno, puede inhibir ó eliminar muchas especies de bacterias, incluyendo a los patógenos más comunes causantes de mastitis. Esta enzima es producida en pequeñas concentraciones por la glándula mamaria bovina (Sordillo y Streicher, 2002). La leche bovina contiene aproximadamente 30 µg/ml de peroxidasa (Reiter, 1985). Los niveles de tiocianato en la glándula mamaria dependen de la composición específica de la dieta en la vaca; mientras que el peróxido de hidrógeno en la glándula mamaria es generado por constituyentes enzimáticos de la leche. El sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno ejerce sus propiedades antibacterianas a través de la producción

de hipotiocianato, un metabolito reactivo formado por la oxidación del tiocianato (Sordillo y col., 1997).

La enzima xantina oxidasa, es una enzima presente en la membrana de los glóbulos grasos de la leche, cataliza la formación de óxido nítrico, el cual bajo condiciones de aerobiosis genera peroxinitrito que es un agente bactericida potente (Hancock y col., 2002).

El sistema de complemento está presente en el suero y en la leche, y es considerado una parte importante en la defensa de la glándula mamaria contra la mastitis (Oviedo-Boyso y col., 2007). El complemento consiste en una serie de proteínas que, una vez activadas, ejercen funciones inmunológicas diversas, tales como opsonización de microorganismos (C3b), quimiotaxis de neutrófilos (C5a) y lisis de bacterias (C5b-9) (Craven y Williams, 1985). El complemento llega desde la sangre en respuesta a un proceso inflamatorio. La concentración de complemento en la glándula mamaria varía dependiendo del momento de la lactancia y del grado de infección de la glándula. Su concentración se halla elevada en calostro, leche mastítica y durante el último tercio de la lactancia (Craven y Williams, 1985).

Las citoquinas son proteínas que juegan un rol esencial en todos los aspectos de la defensa del hospedador, regulando la actividad de las células que participan en la inmunidad innata ó adquirida. El término “citoquina” describe a un grupo heterogéneo de proteínas producidas bajo diversas circunstancias por un amplio espectro de células inmunes y no inmunes (Sordillo y col., 1997).

Hasta el presente, una variedad de citoquinas, como las interleuquinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), factor estimulante de colonias (CEF), interferón-gama (INF- γ), y TNF- α , han sido encontrados tanto en glándula mamaria sana como infectada (Sordillo y Streicher, 2002; Alluwaimi, 2004).

Algunas de estas citoquinas como la IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α están involucradas con la inducción de la inflamación (Dinarello, 1994a). Otras citoquinas, como el receptor antagónico de la IL-1 (IL-1ra) y la IL-10 realizan la desregulación del proceso inflamatorio (Henderson y Poole, 1994; Henderson y Bodmer, 1996). Muchas de estas están envueltas en la activación de linfocitos T y B, su expansión clonal e interacciones con células no linfoides. El balance entre estas citoquinas y otros factores (mediadores como eicosanoides, óxido nítrico, receptores solubles de citoquinas) controlan la inducción, perpetuación o el cese de la inflamación (Henderson y col., 1996).

La IL-1 está relacionada con la estimulación de la respuesta de fase aguda (Tracey, 1994). Ha sido reportado que la IL-1 tiene efectos específicos quimiotácticos y activadores sobre células fagocíticas, además de otros tipos de células (Di Giovine y Duff, 1990; Di Giovine y col., 1991; Dinarello, 1994a). El IL-1ra bloquea la actividad de la IL-1 tanto *in vivo* (Dinarello, 1995) como *in vitro* (Carter y col., 1990; Hannum y col., 1990), llevando así a un entendimiento del rol de esta citoquina en la respuesta inflamatoria.

Interleuquina-1 es secretada por distintos tipos celulares (linfocitos T y B, células NK, granulocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso, queratinocitos, células de Langerhans, osteoclastos, astrocitos, células mesangiales, células del timo y córnea), aunque son los monocitos/macrófagos la principal fuente de producción (Fernández Botran y col., 1996). Cork y Duff (1994) demostraron que la IL-1 estimula la producción de varias citoquinas secundarias que actúan amplificando la inflamación como las IL-6 e IL-8.

Existen dos tipos de IL-1, la IL-1 α e IL-1 β , que poseen una homología de un 25% entre sí. En seres humanos, la IL-1 α es una citoquina regulatoria que puede inducir la activación de factores de transcripción, como el factor nuclear- κ B (FN- κ B) y la proteína activadora 1 (PA-1), y esto promueve la expresión de genes relacionados a la supervivencia celular, proliferación y angiogénesis (Wolf y col., 2001). La IL-1 α , es producida en grandes cantidades por queratinocitos y en menor medida por macrófagos. En bovinos, la IL-1 β es producida por monocitos/macrófagos y células epiteliales. Durante la respuesta inflamatoria, IL-1 β regula la expresión de adhesinas en células endoteliales y el tránsito de neutrófilos en infecciones causadas por *E. coli*. El rol de la IL-1 β en infecciones causadas por *S. aureus* es importante solo en etapas tempranas de infección (Yamanaka y col., 2000; Zhang y Issekutz, 2002).

La IL-2 es producida por linfocitos CD4+ y fue inicialmente descrita como un factor de crecimiento de células T. Esta citoquina regula la respuesta inmune adquirida, ya que estimula el crecimiento y diferenciación de linfocitos B, incrementa la proliferación de células del timo, activa las células NK e induce la activación de linfocitos T. Alteraciones en la producción de IL-2 causan una disminución en la capacidad de respuesta inmune en la glándula mamaria, lo cual contribuye a enfermedades bacterianas como mastitis (Myllys y Honkanen-Buzalski, 1994; Sordillo y Streicher, 2002).

Daley y col. (1991), determinaron que infusiones intramamarias de IL-1 β e IL-2 recombinantes incrementaron el número de células somáticas y activaron la producción de iones superóxidos en leucocitos polimorfonucleares (LPMN) en leche. Además, determinaron que la IL-2 activó la acción fagocítica de estas células. Además, estos autores encontraron experimentalmente que el tratamiento mediante infusión intramamaria con estos dos tipos de citoquinas recombinantes en animales con mastitis causadas por *S. aureus* resultó en una tasa de curación del 40%.

La IL-4 es producida principalmente por los linfocitos T activados y por otros tipos celulares como mastocitos y basófilos activados, linfocitos B y algunos linfocitos T citotóxicos. Existe un receptor específico para IL-4 (CD124) que se expresa en diferentes células, describiéndose también un receptor soluble que puede tener como función bloquear la actividad de esta citoquina (Fernández Botran y col., 1996). Es la principal inductora de linfocitos B, estimulando su proliferación y diferenciación, promoviendo la secreción de IgG e IgE. Además induce la expresión de moléculas del CMH-II en macrófagos y linfocitos B aumentando sus capacidades como células presentadoras de antígenos e inhibe la activación de células NK (Zhou y col., 1994; Tizard, 2000).

La IL-6 es una citoquina proinflamatoria producida por macrófagos y está relacionada con el shock séptico agudo durante la mastitis causada por bacterias coliformes ó *S. aureus*. Esta citoquina facilita el reemplazo de neutrófilos por macrófagos en la glándula mamaria, lo cual es necesario para la reducción de los efectos deletéreos causados por neutrófilos. También, la IL-6 es una de las principales citoquinas regulatorias de la síntesis de proteínas de fase aguda en hepatocitos (Ohtsuka y col., 2001; Slebodzinski y col., 2002). Okada y col. (1997), demostraron que células epiteliales mamarias bovinas criopreservadas sintetizaron IL-1 e IL-6 *in vitro*. Además, obtuvieron transcriptos de ARN mensajero (ARNm) de TNF- α e IL-6 en células epiteliales mamarias bovinas “*in vitro*”. Las citoquinas TNF- α e IL-6 fueron asociadas con la respuesta inflamatoria relacionada a endotoxinas, al encontrarse niveles aumentados en leche y suero de ganado bovino durante una infección natural por bacterias coliformes (Nakajiima y col., 1997). En glándula mamaria infectada con *E. coli*, se detectó expresión del gen para IL-6 de manera temprana a las 14 hs post-inoculación (PI) (Shuster y col., 1997).

La IL-8 es una citoquina producida por muchos tipos de células, incluyendo monocitos-macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, y neutrófilos (Baggiolini y col., 1989). Aunque la IL-8 ha mostrado tener actividades quimiotácticas para linfocitos T, eosinófilos y basófilos, se la considera como el más potente agente quimiotáctico para neutrófilos. Esta citoquina presenta varios tipos de actividades biológicas; además del reclutamiento y activación de neutrófilos (Harda y col., 1994), induce la degranulación de neutrófilos (Schroder y col., 1987), estimulación de fagocitosis de partículas opsonizadas (Detmers y col., 1991) y el reclutamiento de linfocitos T (Leonard y col., 1990; Jinquan y col., 1995). La IL-8 ha sido detectada en secreción mamaria humana (Srivastava y col., 1996). En secreción mamaria bovina, esta citoquina fue detectada en glándula mamaria infectada con *E. coli* (Shuster y col., 1996, 1997). En glándula mamaria con mastitis infectadas por *S. aureus*, la IL-8 está presente en bajas concentraciones (Persson Waller y col., 2003; Alluwaimi, 2004).

La IL-10 de bovinos posee actividades inmunorregulatorias (Goff y col., 1998). Es producida por macrófagos y también puede ser producida por linfocitos T. IL-10 antagoniza la respuesta proinflamatoria mediante la disminución de la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-12 (van Crevel y col., 2002). En seres humanos la IL-10 tiene un amplio espectro de actividades antiinflamatorias/inmunes y ha sido usada como tratamiento para enfermedades inflamatorias e inmunes (de Vries, 1995; Suttles y col., 1999). Riollot y col. (2001), encontraron expresión de ARN mensajero (ARNm) de IL-10 en células somáticas de leche bovina durante mastitis crónica por *S. aureus*. Además, otros autores, demostraron que la IL-10 fue secretada en leche derivada de glándula mamaria infectada con otros patógenos diferentes (Bannerman y col., 2004 a, b, 2005).

La IL-12 es una citoquina mediadora entre la inmunidad innata y la adquirida. Regula la diferenciación de linfocitos T (Hornef y col., 2002). Es producida por macrófagos y células dendríticas activadas. Es un heterodímero compuesto de dos subunidades denominadas p35 y p40. Actúa como factor de crecimiento de células NK (Fainboim y Geffner, 2008). IL-12 e INF- γ han sido encontradas en glándula mamaria bovina en mastitis por *E. coli*. Hisaeda y col. (2001) y Bannerman y col. (2004a), encontraron altos niveles de IL-12 a las 24 hs PI, mientras que para INF- γ encontraron que los niveles se incrementaban a las 120 hs PI, seguido por un descenso a niveles basales. Transcriptos de ARNm para IL-12p40 han sido monitoreados en glándula mamaria bovina a la mitad y al final de la lactancia. Alluwaimi y Cullor, (2002),

encontraron una mayor expresión de esta citoquina al final de la lactancia comparado con el periodo medio de lactancia. Esta diferencia en la expresión de IL-12p40 puede ser atribuida a su rol vital en promover la respuesta inmune en la glándula mamaria, particularmente en la activación de células NK a través del aumento de la síntesis de INF- γ y la regulación del switching (cambio de isotipo) de anticuerpos (Trinchieri, 1995).

El IFN consiste en un grupo de proteínas relacionadas clasificadas en dos tipos principales: El IFN clase I consiste en tres subtipos relacionados: IFN- α , IFN- β e IFN- ω . IFN- α e IFN- β son producidos por una gran variedad de células en respuesta a varios inductores que incluyen infecciones virales, productos bacterianos y células tumorales. En bovinos el gen de IFN- ω codifica para proteínas producidas en el desarrollo temprano del embrión y es referido como IFN- τ . La segunda clase de IFN consiste en una proteína simple: IFN- γ , el cual no se relaciona con la clase I de IFN. Interferón- γ es una citoquina derivada de los linfocitos T que, con frecuencia, se produce en respuesta a estímulos mitogénicos o antigénicos (Alluwaimi, 2004). Interferón- γ bovino es un importante mediador en la activación del reclutamiento de neutrófilos y favorece su capacidad fagocítica (Riollet y col., 2000; Wedlock y col., 2000). Esta citoquina ha sido encontrada en niveles significativamente incrementados en el suero y plasma de bovinos infectados (Hisaeda y col., 2001).

El TNF- α es una de las citoquinas que se secreta tempranamente por células inmunocompetentes en respuesta a la estimulación microbiana. La rapidez de la liberación de esta citoquina reside en que el TNF- α se acumula como una proteína preformada de 26 kDa (pro-TNF- α) sobre la membrana plasmática y es clivada rápidamente hasta quedar como una proteína soluble de 17 kDa por una enzima unida a la membrana, la enzima convertidora de TNF- α (TACE) (Solomon y col., 1999; Murray y col., 2005).

El TNF- α es producido por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. Participa en la actividad quimiotáctica de neutrófilos, ya que induce la expresión de moléculas de adhesión por células endoteliales. El TNF- α es la principal citoquina producida durante la etapa de infección temprana y es el responsable del shock endotóxico que se produce en mastitis aguda causada por *E. coli*. La infusión intramamaria de TNF- α induce un incremento en el número de células somáticas, principalmente un aumento en la cantidad de neutrófilos (Persson y col., 1996).

Al igual que la IL-1, el TNF- α es un poderoso inductor de respuesta inflamatoria, la cual puede mediar directamente o por intermedio de la IL-1 y otras citoquinas proinflamatorias. Así, el TNF- α puede inducir la producción de IL-2, IL4, IL-6, IL-10, IL-1, IL-18 IFN- γ , factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β), factor inhibidor de la migración (MIF), entre otros. Igualmente, esta citoquina puede estimular la producción de hormonas como el cortisol, la epinefrina, el glucagón, la insulina y la norepinefrina (Tracey, 1994; Dinarello y Moldawer, 1999).

Factor de necrosis tumoral- α regula no solo la función de leucocitos fagocíticos sino también de células epiteliales mamarias (Ip y col., 1992; Rejman y col., 1993). El TNF- α ha sido monitoreado y detectado en glándula mamaria bovina normal e infectada (Hoeben y col., 2000; Hisaeda y col., 2001; Riollot y col., 2001; Alluwaimi y Cullor 2002; Dallard y col., 2009). Numerosos estudios han detectado elevados niveles de TNF- α durante toda la lactancia, involución y en el periparto, excepto en un corto periodo antes del parto cuando este disminuye a niveles indetectables. Elevados niveles de TNF- α podrían estar relacionados con el mantenimiento y regulación de las funciones inmunológicas de las células y factores involucrados en los cambios fisiológicos de la glándula mamaria (Sordillo y Babiuk, 1991; Rewinski y Yan, 1994; Sordillo y col., 1997).

1.2.2. Defensas inducibles de la glándula mamaria

La participación de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS) es un elemento clave en la actividad antibacteriana de macrófagos activados en la glándula mamaria (MacMicking y col., 1997). Este complejo enzimático cataliza la conversión de arginina en citrulina y óxido nítrico (ON). Este reacciona con oxígeno transformando el nitrato en nitrito (compuestos bactericidas).

Las concentraciones de ON en leche y calostro son bajas pero aumentan en forma transitoria luego de la infección con *E. coli*. (Blum y col., 2000). Los macrófagos bovinos son capaces de secretar ON cuando son estimulados por componentes de la pared de bacterias Gram (-) y coestimulados por citoquinas como INF- γ (Jungi y col., 1999). Estudios inmunohistoquímicos localizaron en glándula mamaria de rata al complejo enzimático de la óxido nítrico sintetasa en la zona basal de los alvéolos y en conductos lactíferos de órganos en cultivo expuestos a LPS (Onoda e Inano, 1998).

Otra clase de defensa inducible en la glándula mamaria bovina es la Proteína Sérica Amiloide A (Serum amyloid A -SAA-). Esta es una proteína de fase aguda, sintetizada en hígado, que durante la mastitis se incrementa marcadamente en plasma en asociación con lipoproteínas de alta densidad. Un rápido incremento en las concentraciones de SAA ha sido localizado en leche tanto de vacas con mastitis clínica como subclínica (Eckersall y col., 2001; Gronlund y col., 2005).

Los péptidos de defensa del hospedador, constituyen una familia de proteínas altamente conservada entre las especies, con un tamaño aproximado entre los 12 a 50 aminoácidos. Las principales fuentes de estos péptidos son los granulocitos, monocitos, macrófagos y células epiteliales. En el bovino, docenas de estos péptidos han sido descritos, ejemplos de esto son: las defensinas de neutrófilos (Selsted y col., 1993; Yount y col., 1999) y péptidos antimicrobianos linguales (PAL) de epitelio lingual, intestinal y respiratorio (Stolzenberg y col., 1997) o péptidos antimicrobianos traqueales (PAT), la primer β -defensina descrita (Diamond y col., 1991).

1.2.3. Defensas reclutadas de la glándula mamaria

Los macrófagos activos, que junto a neutrófilos, migran desde la sangre a la glándula mamaria durante la fase inicial de la reacción inflamatoria (Duffield, 2003), disparan la liberación de: prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas y contribuyen a aumentar el proceso inflamatorio local. Los macrófagos de la leche son menos activos y menos eficientes que los monocitos de la sangre en la producción de IL-1 (Politis y col., 1991).

Las células epiteliales mamarias (CEM) son capaces de producir mediadores inflamatorios en respuesta a la invasión bacteriana, como: citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y péptidos de defensa del hospedador. Otros autores han comenzado a elucidar el rol directo de las CEM en la estimulación de la respuesta inmune innata (Pareek y col., 2005; Strandberg y col., 2005; Lahouassa y col., 2007), donde describieron que esta células responden de manera rápida y vigorosa frente a niveles bajos de componentes de la pared bacteriana, con la expresión de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas (Boudjellab y col., 2000). Además, las células epiteliales estarían involucradas también en el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos en la leche (Rainard y Riollot, 2003).

1.3. Involución de la glándula mamaria bovina

La existencia de un periodo no lactante previo al parto en vacas lecheras, comúnmente denominado periodo seco, es importante para la producción óptima de leche en la lactancia siguiente. No solo es importante la existencia de este periodo como tal, ya que sin periodo de secado la producción de leche puede reducirse en un 20 %, sino que, además, es importante también la duración del mismo, ya que para que la producción sea óptima se requiere un periodo de secado de 40-60 días (Coppock y col., 1974).

La glándula mamaria pasa por varias fases en el periodo seco como ser: la fase de involución activa, la fase de involución estable y la fase de calostrogénesis:

1.3.1. Fase de involución activa

La fase de involución activa es la más crítica debido a los cambios que acontecen en la glándula mamaria, haciéndola más propensa a las infecciones. La glándula sigue produciendo leche en la misma cantidad, pero hay un incremento en la presión intramamaria haciendo que se inhiba su actividad. Durante mucho tiempo ha sido aceptado que el cese en la producción de leche marca el inicio del proceso de involución de la glándula mamaria que se efectúa durante el periodo seco (Hurley, 1999; Goff y Horst, 1997), proceso que se caracteriza por la disminución en el número de células epiteliales mamarias (Capuco y col., 1997). Durante la fase de involución activa, se intenta reducir la cantidad de leche en la glándula al momento de la interrupción de la lactancia para que, indirectamente, los riesgos de IIM sean menores durante la primera semana de la involución. Además, en esta etapa, las células epiteliales alveolares comienzan a degenerar y gradualmente la leche residual de la luz alveolar es reabsorbida por el tejido intersticial. La característica de la glándula mamaria involucionada es que tiene más tejido intersticial que elementos epiteliales. Todo lo que queda del parénquima son solamente grupos aislados de conductos ramificados con ausencia o unos pocos alvéolos muy pequeños.

Aparecen también grandes vacuolas citoplasmáticas que encierran agregados de partículas proteicas y, más adelante, se observan en las vacuolas organoides citoplasmáticos en distinto grado de degradación. Finalmente las células degeneradas y

los desechos son eliminados por medio de macrófagos u otras células fagocíticas. La acumulación de productos secretorios y formación de vacuolas coinciden con la inhibición de la síntesis y secreción de leche (Hurley, 1989).

Además, en esta etapa de involución activa, existen cambios en la composición de la secreción láctea; comienza a aumentar la concentración de LF, que además de ligar el Fe, el cual es un nutriente esencial para determinadas bacterias causantes de mastitis, también tiene un papel fundamental a la hora de atraer a los LPMN y macrófagos. La concentración de citrato sigue siendo elevada y la síntesis de grasa, lactosa y caseína disminuye considerablemente. Existe una mayor concentración de neutrófilos y de macrófagos, encargados de la reabsorción celular. Los neutrófilos predominan durante los primeros días de involución; luego de esto, los leucocitos mononucleares (macrófagos y linfocitos) son el tipo de células más abundantes (Jensen y col., 1981; McDonald y Anderson, 1981; Hurley y col., 1987). Existen también cambios anatómicos del pezón, que se ensancha y se acorta debido a la presión intramamaria y esto facilita la entrada de bacterias, puesto que el tapón de queratina aun no está completamente formado. Consecuentemente, la respuesta inmunitaria que se debería dar frente a una nueva infección no es suficiente debido a que los LPMN y macrófagos están comprometidos en la reabsorción celular y la acción quelante del hierro de la LF (encargada de la quimiotaxis) se inhibe por la alta concentración de citrato (Smith y Oliver, 1981).

1.3.2. Fase de involución estable

Una vez superada la fase de involución activa, la ubre entra en involución estable y alcanza su volumen más bajo. Es la fase de más resistencia a las infecciones intramamarias ya que el sistema inmunitario está funcionando al 100 %, la LF alcanza su máxima concentración y el citrato disminuye, dejándola actuar libremente, con lo cual la incidencia de mastitis causadas por *E. coli* y estafilococos se reduce, pero no así la causada por estreptococos (Holst y col., 1987; Hurley, 1989).

1.3.3. Fase de calostrogénesis

La fase de calostrogénesis empieza dos semanas antes del parto, la glándula se prepara para producir y almacenar calostro. Existe un aumento del volumen de la ubre, las células alveolares aumentan en número y en actividad y hay un incremento considerable del flujo sanguíneo, lo cual puede provocar una mayor incidencia de edemas mamarios. La concentración de LF empieza a disminuir, la del citrato a aumentar y a su vez se eleva la concentración de grasa, lactosa y caseína que, en definitiva, son nutrientes para las bacterias. El conducto del pezón también se dilata y acorta debido a la mayor presión intramamaria, facilitando el acceso de patógenos al interior de la ubre. Normalmente, en esta etapa, también se produce un cambio de alimentación del animal y se lo lleva a un corral distinto, lo cual hace que la vaca esté más estresada comprometiendo así la función inmunitaria. Debido a esto aumenta la tasa de nuevas infecciones intramamarias (Hurley, 1989).

1.3.4. Citología presente en la involución

Una posibilidad para evaluar la salud de la glándula mamaria es el recuento de células somáticas (RCS). Las células somáticas de la leche son consideradas generalmente como un importante parámetro para la detección de mastitis, debido a que la inflamación de la glándula mamaria resulta en un aflujo de células, predominantemente LPMN, desde la sangre hacia la misma (Burvenich y col., 1994).

Las células somáticas de la leche pueden provenir tanto de la descamación del epitelio mamario, como del sistema inmune. La concentración de células (determinada por el RCS) y la distribución de los tipos celulares han sido estudiadas durante la involución en numerosas especies, incluyendo, cerda, cobayo, oveja y vaca (Nordin y Lee, 1982; Lee y col., 1983; Colditz, 1988; Tatarczuch y col., 2000). En todas estas especies, los LPMN aumentan abruptamente después del destete y predominan durante la involución temprana. A medida que la involución avanza, los macrófagos comienzan a ser el tipo celular dominante (Monks y col., 2002). Ambos tipos celulares, neutrófilos y macrófagos han sido descritos conteniendo vacuolas fagocíticas con micelas caseínicas, gotas lipídicas y restos celulares, sugiriendo que estas células jugarían un rol

en el *clearance* de restos de leche y/o fragmentos de células muertas (Lee y col., 1983; Tatarczuch y col., 2000).

Presentes pero en menor número, se encuentran las células epiteliales viables, células epiteliales descamadas (supuestamente desprendidas del seno de la glándula), eosinófilos y linfocitos T y B. A medida que la cantidad de leche secretada decrece rápidamente, la cantidad de células somáticas por mililitro de leche aumenta (Nickerson, 1989). Aunque el perfil de infiltración es característico de la respuesta inmune innata de mucosas, Paape y col. (2000), reportaron que los LPMN migran constantemente dentro de la glándula mamaria bovina y el número de LPMN infiltrantes se incrementa con una infección bacteriana activa. Esta constante migración de LPMN dentro de la glándula mamaria ha sido también descrita en cabras (Manlongat y col., 1998) pero no en roedores y seres humanos.

En vacas sanas, el número, diversidad celular y función de los leucocitos dentro de la glándula mamaria pueden contribuir a la defensa contra patógenos invasores (Dosogne y col., 2003). Se ha demostrado que tanto en infecciones naturales (Vandeputte-Van Messom y col., 1993; Shuster y col., 1996) como en inducidas artificialmente (Nickerson y col., 1990) el incremento del número de células somáticas ejerce un efecto de protección contra la severidad de una infección en la glándula mamaria.

1.4. Inmunomodulación en la glándula mamaria

La manipulación del sistema inmune puede tener un alto impacto en la preservación y restauración en la salud animal.

La inmunomodulación es un término amplio que denota cualquier cambio en la respuesta inmune e implica su regulación, supresión, ó intensificación (Hu, 2002). La inmunoestimulación se requiere cuando a pesar de funcionar con normalidad, la actividad natural del sistema inmunitario del huésped no es suficiente para reducir la carga infectiva (infecciones recurrentes) o cuando puede considerarse una medida terapéutica coadyuvante (como en la terapia del cáncer) para restituir el potencial del sistema inmunitario.

El efecto inmunomodulatorio se puede lograr a través del uso de sustancias de origen biológico ó químico para producir una respuesta inmune adecuada al estado que

se desea tratar. Así, en algunos casos, la finalidad será aumentar la intensidad de la respuesta (estrés, vacunación, infecciones), mientras que en otros casos se tratará de reducirla (enfermedades autoinmunes, trasplantes, alergias, hipersensibilidad).

Los compuestos inmunomoduladores tienen la facultad de aumentar (inmunoestimulantes) o disminuir (inmunosupresores) las funciones del sistema inmunitario. Éstos compuestos pueden diferenciarse en sustancias que inducen reacciones inmunes (parainmunización) y sustancias que suplantán o reemplazan las reacciones inmunes primitivas (citoquinas) (Zecconi, 2000).

Un inmunomodulador ideal, según la clasificación de Quinn (1990), debe poseer una serie de características para su uso en los animales domésticos:

- No debe ser tóxico o pirogénico, aún en dosis elevadas, ni poseer actividad mutagénica, carcinogénica o tener algún efecto adverso a largo plazo.
- Si es administrado con vacunas debe tener un efecto adyuvante e incrementar la respuesta inmune.
- Debe estimular la inmunidad inespecífica frente a patógenos.
- Debe incrementar la respuesta primaria y secundaria a agentes infecciosos.
- El producto debe ser inactivo o biodegradado en el medio ambiente.
- Debe ser activo por vía oral y mantener su estabilidad en agua y alimentos.
- Debe ser compatible con otros fármacos incluidos antibióticos y antiparasitarios.

Muchos inmunomoduladores se basan en el uso de agentes microbianos, ó sus productos (Zecconi y col., 1999; Inchaistri y col., 2000; Dallard y col., 2008). El tipo de actividad de estos compuestos depende de su mecanismo de acción, sitio de acción, dosis y tiempo de administración (Tzianabos, 2000). Por lo tanto el uso de inmunoestimulantes en bovinos puede convertirse en una alternativa eficaz a los métodos tradicionales de control de las IIM (Campos y col., 1993).

Otros nombres que reciben éstos tipos de compuestos son: inmunopotenciadores, inmunoestimulantes, agentes inmunoterápicos y modificadores de la respuesta biológica (MRB). El término “Modificadores de la respuesta biológica” puede ser referido a aquellos agentes que modifican la respuesta a patógenos del hospedador y que tienen efectos benéficos sobre una enfermedad. El ejemplo más conocido de MRB son las vacunas, en donde la administración de una forma no patogénica de un microorganismo, induce al sistema inmune a producir una respuesta más efectiva ante subsecuentes infecciones con el mismo patógeno (Campos y col., 1993).

Otros ejemplos de MRB para el control de mastitis durante el periodo prenatal, además de la estimulación mediante vacunación, son el uso de antiinflamatorios y de INF- γ (Campos y col., 1993).

El blanco principal de estos MRB son los linfocitos T y B, las células NK, monocitos-macrófagos y granulocitos. Sin embargo, componentes solubles del sistema inmune, como citoquinas, inmunoglobulinas, y moléculas del complemento pueden ser utilizados como estrategias para inmunomodulación (Sordillo y Streicher, 2002).

1.4.1. Mecanismos de acción

Es limitado el conocimiento en relación al mecanismo de acción preciso de muchos MRB. Sin embargo, evidencia sustancial, indica que la mayoría de los MRB ejerce su actividad a través de la habilidad de modular los mecanismos inmunes innatos. El resultado final depende de la habilidad de estos MRB a incrementar ó disminuir éstos mecanismos (Campos y col., 1993).

Los MRB actúan a diferentes niveles del sistema inmune, inhibiendo o intensificando selectivamente poblaciones o subpoblaciones de células para la respuesta inmune como: linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK, citotóxicas (CTL), o la producción de mediadores solubles como las citoquinas (Stites y col., 1985; Morris y col., 1999). Muchas de las formas de acción de los MRB están basadas en la alteración que producen en la actividad de las células inmunes; como ser cambios en la expresión genética, en el transporte intracelular de proteínas y la secreción y expresión de proteínas en la superficie celular, lo cual induce cambios celulares que pueden influir en el inicio, consecución y regulación de la respuesta inmune (Quinn, 1990; Pell, 1995).

En seres humanos y animales, los inmunomoduladores pueden actuar de forma específica o inespecífica:

1.4.1.1. Inmunomoduladores de acción inespecífica

Son agentes que logran una estimulación o supresión de la respuesta inmune sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado. Se diferencian en tres tipos según su acción (Stites y col., 1985; Takx-Köhlen, 1992), los que actúan sobre el sistema inmune normal (Tipo I); los que actúan sobre el sistema

inmune inmunodeprimido (Tipo II); los que actúan sobre el sistema inmune funcionalmente normal o inmunodeprimido (Tipo III).

1.4.1.2. Inmunomoduladores de acción específica

Logran su acción sobre células del sistema inmune, por la presencia de un antígeno o inmunógeno dado, por lo que hay especificidad selectiva en la acción de estas células para producir una respuesta inmune. La inmunomodulación es selectiva cuando hay estimulación y su resultado significa una inmunorreacción hacia un antígeno o varios, como es el caso de los adyuvantes inmunológicos o las vacunas terapéuticas (Stites y col., 1985; Takx-Köhlen, 1992; Gupta y col., 1995).

1.4.2. Compuestos inmunomoduladores

Estos agentes se han utilizado individualmente en la glándula mamaria para potenciar regímenes de terapia antibiótica o de inmunización específica (vacunas). Existen muchos estudios basados en la aplicación de MRB en glándula mamaria con el objetivo de incrementar la resistencia frente a IIM (Campos y col., 1993; Zecconi, 1999), lo que podría convertirse en una alternativa eficaz a los métodos tradicionales de control de las IIM al momento del secado, utilizando productos que generen efectos profilácticos ó terapéuticos para contrarrestar la patogénesis de la infección (Campos y col., 1993).

Un ejemplo del empleo de éstos compuestos es el uso de citoquinas, el cual no constituye una terapia suficiente para el tratamiento contra mastitis por *S. aureus* (Alluwaimi, 2004; Takahashi y col., 2004), pero pueden mejorar los efectos bactericidas que causan ciertos antibióticos (Alluwaimi, 2004). Así, muchas citoquinas tales como la IL-2 recombinante bovina (Daley y col., 1990, Nickerson y col., 1992), IFN- γ (Quiroga y Nickerson, 1993), factores estimulantes de colonias de granulocitos (Nickerson y col., 1989, Kehrlí y col., 1991) y otras sustancias como β 1,3-glucan (Inchaisri y col., 2000) e inmunomoduladores obtenidos de *Parapox ovis* (Zecconi y col., 1999) han sido usados como estimulantes de la respuesta inmune en la glándula mamaria bovina.

El LPS es un componente que se encuentra en mayor proporción en la pared de bacterias Gram (-), ha sido utilizado como un potente estimulante del sistema

inmunitario con diferentes efectos biológicos e inmunoestimulantes. Su efecto inmunológico depende, básicamente, del lípido A, el cual está constituido por una estructura de disacáridos (diglucosamina fosforilada en las posiciones 1 y 4, con seis ácidos grasos distribuidos asimétricamente) (Mueller y col., 2005). Dallard y col. (2008, 2009) encontraron que el tratamiento con un MRB cuyo componente principal era el LPS bacteriano, redujo la proporción de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* al día 7 de la involución mamaria. Además, observaron que en cuartos infectados, el MRB produjo un incremento significativo en el número de mastocitos y monocitos-macrófagos a los 7, 14 y 21 días de la involución sin alterar la arquitectura normal de la glándula mamaria bovina durante la involución.

Zhen y col. (2009), probaron que infusiones intramamarias con inmunoglobulina Y (IgY) proveniente de la yema de huevo en vacas con mastitis causada por *S. aureus*, mejoraban la calidad de la leche, disminuyendo el RCS y el recuento bacteriano en la misma. Además, probaron que la tasa de curación de mastitis mejoraba significativamente respecto de vacas tratadas con penicilina, concluyendo así, que la terapia con IgY constituía una alternativa potencial para la mastitis.

Numerosos reportes han documentado el efecto del quitosano sobre la inhibición bacteriana de organismos como *S. aureus* y *E. coli* (Allan y Hadwiger, 1979; Sudarshan y col., 1992; Seo y col., 1992; Darmadji and Izumimoto, 1994), sobre la prevención de la inmunosupresión luego de cirugías y para el mejoramiento de la tasa de curación en vacas con mastitis (Moon y col., 1998). Además, Minami y col. (1997) observaron que el número de fagocitos y su actividad oxidativa en secreción mamaria se vio incrementada luego de la administración de quitosano tanto en vacas sanas como mastíticas.

Azadirachta indica (*A. indica*) (Meliaceae) es una de las plantas más versátiles con inmensas actividades biológicas (Biswas y col., 2002). *A. indica* posee actividades antibacterianas (Almas, 1999), anti-inflamatorias (Pillai y Santhakumari, 1981), e inmunomodulatorias (Upadhyay y col., 1992), por lo tanto fue usada para tratar infecciones de glándula mamaria en rumiantes (Williamson, 2002). Mukherjee (2009) encontró que infusiones intramamarias con extractos de *A. indica* produjeron una reducción en el RCS, en el conteo total bacteriano, así como un aumento en la actividad bactericida de neutrófilos y de la expresión de citoquinas proinflamatorias en glándula

mamaria bovina, concluyendo que la terapia con *A. indica* mostraba actividades antiinflamatorias, antibacterianas e inmunomodulatorias en bovinos con mastitis.

1.5. *Panax ginseng* como Modificador de la Respuesta Biológica

1.5.1. Propiedades de *Panax ginseng*

El ginseng es la raíz del *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae) cuyo nombre en chino es “*Renshen*”. “*Ren*” significa humano en Chino ya que muchas raíces de ginseng se parecen a la figura humana, por otra parte “*Shen*” significa hierba en la antigua China (Gao, 2000) (figura 4). La raíz del ginseng contiene múltiples constituyentes activos incluyendo, ginsenósidos, polisacáridos, péptidos, alcoholes poliacetilénicos y ácidos grasos que tienen diferentes efectos sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos, así como, sobre la función neuroendócrina, inmune, cardiovascular y del sistema nervioso central en seres humanos (Gillis, 1997; Attele y col., 1999).



Figura 4: Imagen representativa de la raíz de *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae) con forma de humano (<http://www.marianosastre.com/wp/wp-content/uploads/2009/ginseng.jpg>).

El mayor constituyente del ginseng son las saponinas, las que son consideradas su componente activo (Wang y col., 1979). Las saponinas están constituidas por una aglicona (triterpeno o esteroide) unida a uno o varios azúcares (Makkar y Becker, 1996). Las saponinas aisladas del ginseng son llamadas ginsenósidos y están constituidas por glicósidos triterpenoides con un esqueleto damarane (Chen y Zhang,

2001). Los ginsenósidos pueden ser hidrolizados en dos partes: azúcares y sapogeninas (Chen y Zhang, 2001). Basado en la estructura de las sapogeninas, los ginsenósidos se dividen en tres tipos: protopanaxadiol, protopanaxatriol y ácido oleanólico.

Han sido identificados más de 30 ginsenósidos y uno de los más abundantes es el ginsenósido Rb1, constituyendo entre el 0,37-0,5 % de un extracto de ginseng (Zhu y col., 2004; Wang y col., 2005). Las saponinas son compuestos tensoactivos y algunas de ellas son fuertes detergentes y pueden causar hemólisis de glóbulos rojos e inducir severas reacciones locales cuando son inyectadas parenteralmente, lo cual limita su uso en vacunas. En estudios realizados por Hu y col. (2001) con inyecciones parenterales de altas dosis de extractos de ginseng en ratón, cobayo, visón, cerdo y bovino no se observaron reacciones adversas y no se registraron reacciones de hemólisis en pruebas *in vitro* en las cuales se incubaron extractos de ginseng con glóbulos rojos de bovinos y cerdos (Rivera y col., 2003).

1.5.2. Antecedentes como inmunomodulador

Estudios previos realizados en seres humanos mostraron que el ginseng y sus componentes activos son potentes inmunomoduladores. En mayor parte, sus efectos inmunomodulatorios son debidos al efecto regulatorio en la producción de citoquinas y en la actividad fagocítica de monocitos-macrófagos y células dendríticas, así como en la activación de linfocitos T y B (Ho y col., 2004; Tan y Vanitha, 2004).

En investigaciones realizadas por Hu y col. (1995) y Concha y col. (1996) se ha observado que el extracto de raíz de *Panax ginseng* (*P. ginseng*) puede estimular significativamente la actividad de los neutrófilos así como también de linfocitos de sangre periférica y leche bovina *in vitro*. Sin embargo, los efectos del ginseng *in vivo* no son claros. En estudios realizados por Hu y col. (2001), la inyección subcutánea (SC) de ginseng disminuyó el crecimiento bacteriano y el RCS en leche en cuartos infectados subclínicamente con *S. aureus*. Además el número de monocitos y linfocitos se incrementó en animales tratados con extractos de ginseng comparado con animales controles. Estos hallazgos sugieren un incremento en la resistencia a la infección por *S. aureus* en glándula mamaria luego del tratamiento con ginseng. Estos resultados concuerdan con los estudios de Song y col. (1997) en los cuales se detectó una mejora en el *clearance* bacteriano y una disminución en los cambios patológicos en pulmón en

ratas atímicas con neumonía crónica por *Pseudomonas aeruginosa* después de la inyección SC de extracto de ginseng. Los estudios *in vitro* realizados por Hu y col. (1995) mostraron que la actividad fagocítica y oxidativa de los neutrófilos de sangre periférica y leche bovina fueron mayores cuando las células se cultivaron con ginseng. Los estudios *in vivo* realizados por Hu y col. (2001), mostraron que la inyección SC de ginseng en vacas en lactancia con mastitis subclínicas por *S. aureus* incrementó significativamente la actividad fagocítica y oxidativa de los neutrófilos sanguíneos. Una mejora de la función de los neutrófilos podría explicar la reducción del número de bacterias en muestras de leche de bovinos tratados con extracto de ginseng.

Se han comprobado efectos inmunomoduladores del ginseng *in vivo* en otras especies. Por ejemplo, se ha observado un incremento en la fagocitosis por neutrófilos y proliferación de linfocitos en rata y ratón (Liu y col., 1982; Liu y Zhang, 1995). Scaglione y col. (1990) observaron en seres humanos un incremento en la quimiotaxis y actividad fagocítica de neutrófilos como respuesta a la administración oral de un extracto de ginseng. Scaglione y col. (1994) también demostraron un incremento en la fagocitosis y muerte intracelular en macrófagos humanos después de la administración oral de un extracto de ginseng.

La mejora de la respuesta inmune podría ser atribuida a los ginsenósidos que incrementan la producción de citoquinas (Yang y Yu, 1990; Liu y Zhang, 1996) que, entre otras funciones, influyen en el mecanismo de la respuesta inmune no específica. Las citoquinas liberadas son principalmente IL-1, IL-6, IL-8 e INF- γ y TNF- α (Babiuk y col., 1991; Verhoef, 1991; Sordillo y Babiuk, 1991; Sordillo y col., 1993; Shuster y col., 1993; Nakajima y col., 1997).

Cabe aclarar, que no existen, hasta el momento, antecedentes de aplicación intramamaria de extractos de *P. ginseng* en bovinos. Por lo tanto, conocer los mecanismos de la respuesta inmune inespecífica (posiblemente mediada por citoquinas) a la infusión intramamaria de *P. ginseng* contribuirá a esclarecer los procesos histofisiológicos que ocurren en la glándula mamaria y de esta manera, se sentarán las bases para comprender el efecto de este compuesto como inmunomodulador en el periodo de involución mamaria.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Determinar el efecto de la inoculación intramamaria de un extracto de *Panax ginseng* en vacas Holstein al final de la lactancia, analizando parámetros de respuesta inmune inespecífica, evaluando las diferencias en animales tratados con el extracto y controles.

2.2. Específicos

a) Evaluar el grado de proliferación celular en glándula mamaria cuantificando la expresión por inmunohistoquímica (IHQ) de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) analizando el efecto del tratamiento con extracto de *Panax ginseng*.

b) Evaluar el efecto del extracto de *Panax ginseng* sobre la respuesta inmune no específica a través de la identificación y cuantificación de TNF- α , IL-1 α , IL-6 y CD14 en tejido mamario por inmunohistoquímica (IHQ).

c) Determinar la presencia de la proteína TNF- α en leche y tejido glandular mamario bovino mediante Western blot luego de la inoculación del extracto de *Panax ginseng*.

d) Caracterizar la síntesis de citoquinas por RT-PCR en leche estableciendo diferencias entre animales tratados con el extracto de *Panax ginseng* y controles.

2.3. Accesorio

Realizar el recuento de células somáticas en leche diferenciando tipos celulares, mediante un método directo y citometría de flujo, analizando las correlaciones entre ambas técnicas utilizadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Extracto de *Panax ginseng* (EPg)

Se utilizó un extracto seco de *Panax ginseng* (*P. ginseng*) (Lote N° 29559/M1), conteniendo saponinas equivalentes a 27 % expresados como ginsenósido Rg1 generosamente provisto por la compañía Indena SPA, Milán, Italia. La solución stock se preparó disolviendo el extracto en solución salina (CINa al 0,89 %) para llegar a una concentración final de 45 mg de extracto de *P. ginseng* por ml. Esta solución se esterilizó por filtración con membrana de 0,22 μm y se conservó a temperatura ambiente por hasta tres semanas antes del inicio del experimento. La solución fue convenientemente diluida en solución fisiológica para la realización de ensayos dosis-respuesta con el objetivo de seleccionar la dosis adecuada que generara un incremento de las células somáticas sin producir efectos adversos. Todas las formulaciones a inocular fueron previamente controladas para determinar su esterilidad por inoculación en agar sangre e incubación a 37°C por 48 hs.

3.1.1. Ensayos dosis-respuesta

Se utilizaron tres vacas Holstein no preñadas en el último tercio de la lactancia con una producción aproximada de 8 kg de leche diarios al inicio de la experiencia. La unidad experimental fue el cuarto mamario y se utilizaron tres concentraciones distintas de EPg (1, 5 y 10 mg/ml) en un volumen final de 10 ml. De un total de 12 cuartos, 3 cuartos fueron inoculados con 1 mg/ml de EPg, 3 cuartos con 5 mg/ml de EPg y 3 cuartos con 10 mg/ml de EPg. Paralelamente 3 cuartos fueron inoculados con placebo (solución salina). Para la selección de los animales del ensayo, 7 días previos a la inoculación experimental, se realizaron análisis bacteriológicos y RCS, incluyéndose solo cuartos libres de IIM.

Los animales fueron ordeñados dos veces por día durante el ensayo. Las muestras de secreción mamaria fueron asépticamente colectadas utilizando procedimientos estándar (Hogan y col., 1999) un día antes de la inoculación del EPg, inmediatamente antes de la inoculación (0 hs) y al día 1 (24 hs), día 2 (48 hs) y día 3 (72 hs) PI para realizar análisis bacteriológicos y RCS. Los dos primeros chorros de leche de cada cuarto mamario fueron descartados, los siguientes 5 ml de leche fueron colectados en

recipientes de plástico estériles para análisis bacteriológicos y 30 ml en viales plásticos para RCS. Los pezones fueron sumergidos en una solución yodada al 0,5 % luego de la toma de muestras.

Durante el ensayo se realizó la inspección clínica de los animales y se registraron las temperaturas rectales inmediatamente antes de la administración del EPg y cada 24 hs PI coincidente con la toma de muestras. Los cuartos mamarios fueron examinados clínicamente por palpación y por observación macroscópica del aspecto de la secreción mamaria. Al estado clínico de la glándula se lo clasificó arbitrariamente sobre la base del grado de inflamación como: tejido normal, inflamación moderada e inflamación intensa. El examen bacteriológico se efectuó sembrando 10 μ l de secreción mamaria en placas de agar suplementado con 5% de sangre bovina e incubándose por 48 hs en forma aeróbica. Las placas fueron examinadas a las 24 y 48 hs para desarrollo e identificación de colonias bacterianas aisladas de acuerdo con procedimientos estándar (Hogan y col., 1999).

El RCS se realizó mediante un equipo automático, Somacount 300 (Bentley Instruments- Minesotta-USA), en el Laboratorio Regional de Servicios Analíticos (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los resultados se expresaron como el Log_{10} del RCS.

Debido a que en los cuartos mamarios inoculados con las dosis 1 y 5 mg/ml de EPg se obtuvieron perfiles de RCS similares, se decidió realizar un nuevo ensayo probando una dosis intermedia (3 mg de extracto seco/ml). La dosis de 10 mg/ml no fue considerada, ya que el perfil del RCS mostró alteraciones en sus valores, no relacionadas al tratamiento y un leve aumento durante todo el periodo de evaluación que no superó los valores obtenidos con la inoculación de 5 mg/ml.

Para el nuevo ensayo dosis-respuesta se utilizaron dos vacas Holstein no preñadas en el último tercio de la lactancia, con aislamientos bacteriológicos negativos. De un total de 8 cuartos, 4 cuartos fueron inoculados con 3 mg/ml de EPg, 2 cuartos con placebo (solución salina) y 2 cuartos fueron mantenidos como controles (sin inoculación). Solo se incluyeron cuartos libres de IIM. La toma de muestras e inspecciones clínicas se llevaron a cabo como se detalló anteriormente para el primer ensayo-dosis respuesta.

3.2. Animales y diseño experimental

Se utilizaron 6 vacas Holstein en la etapa final de la lactancia, pertenecientes al rodeo experimental de la EEA Rafaela del INTA, con una producción aproximada de 8 kg de leche diarios. Las vacas fueron seleccionadas sobre la base de ausencia de IIM, de acuerdo con procedimientos recomendados por el National Mastitis Council (Hogan y col., 1999). Se utilizaron animales con similar número de lactancias (entre 2 y 4) y con 320-360 días en lactancia.

La unidad experimental fue el cuarto mamario. La asignación de los distintos tratamientos para cada cuarto mamario fue elegida al azar, verificando que cada una de las ubres reciba todos los tratamientos (Inchaisri y col., 2000). Del total de cuartos disponibles, 8 fueron inoculados con 10 ml de la solución del EPg (3 mg del extracto seco/ml), 8 con 10 ml de placebo, el cual consistió en vehículo sin principio activo, y 8 fueron mantenidos como controles (libres de inoculación). Dos cuartos inoculados con placebo y 2 cuartos controles, no fueron considerados para el ensayo debido a que presentaron alto RCS al momento del inicio del ensayo (tiempo 0 hs). El ordeño fue interrumpido inmediatamente después de las inoculaciones.

Muestras de secreción mamaria fueron colectadas asépticamente siguiendo procedimientos estándares (Hogan y col., 1999), tres días antes de la inoculación del EPg, inmediatamente antes de la inoculación y 48 hs PI para realizar análisis bacteriológicos. Luego de la toma de muestras, los pezones fueron sumergidos en antiséptico conteniendo 0.5% de solución yodada.

3.3. Inspecciones clínicas

Los cuartos mamarios fueron examinados clínicamente por palpación y por determinación de la alteración macroscópica de la secreción mamaria. Al estado clínico de la glándula se lo clasificó arbitrariamente sobre la base del grado de inflamación como: tejido normal, inflamación moderada e inflamación marcada. Además, 10 µl de leche provenientes de cada cuarto mamario incluido en el ensayo, se sembraron en placas de agar sangre suplementado con 5% de sangre bovina y posteriormente se las incubó por 48 hs en aerobiosis. Luego de 24 y 48 hs post-incubación, las placas fueron analizadas para detectar desarrollo bacteriano.

Para determinar el efecto del EPg en cuartos tratados y no tratados, sólo se tuvieron en cuenta las muestras provenientes de aquellos cuartos que no presentaron signos de IIM sobre la base de los cultivos bacteriológicos, para las diferentes técnicas aplicadas en este trabajo.

3.4. Recuento de células somáticas

Muestras de leche provenientes de cada cuarto en estudio, fueron conservadas a 4°C con azidiol para mantener el estado original de las mismas y permitir su mejor procesamiento. Las muestras fueron analizadas mediante un contador automático Somacount 300 (Bentley Instruments, Minesotta, USA) en el Laboratorio Regional de Servicios Analíticos (Esperanza, Santa Fe, Argentina) por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el Log₁₀ del RCS obtenido para cada cuarto en estudio.

3.5. Recolección de muestras de leche para técnicas de Biología Molecular

Las muestras de secreción mamaria para la realización de las técnicas de RT-PCR y western blot, fueron colectadas de manera aséptica. Cien ml de leche provenientes de cada cuarto inoculado, fueron colectados en viales estériles y procesados inmediatamente a 4°C. Se tomaron muestras de leche previo a la inoculación (0 hs) y a las 24, 48 y 72 hs PI.

Puntualmente, para la técnica de RT-PCR, se recolectaron 50 ml de leche. Se realizó el desengrasado y obtención de pellet de células somáticas, mediante centrifugación a 1200 g durante 20 minutos a 4°C, para evitar la ruptura celular, y posteriormente el lavado del pellet formado con buffer fosfato salino (PBS) estéril 0,01M (pH 7,2) (Murrieta y col., 2005). Inmediatamente después el mismo fue congelado a -80°C para evitar la degradación celular y pérdida de ARN.

3.6. Toma y procesamiento de las muestras de tejido mamario

Luego de las inoculaciones y de la toma de muestras de leche a distintos tiempos, los animales se sacrificaron a los 7 días PI en un matadero local. Las muestras de tejido mamario fueron tomadas de tres zonas distintas de la glándula a una profundidad de 4

cm según trabajos previos (Capuco y col., 1997; Dallard y col., 2010), zona 1: porción del parénquima mamario adyacente a la cisterna de la glándula, zona 2: porción entre la cisterna de la glándula y el límite dorsal del parénquima mamario, zona 3: porción cercana al límite dorsal del parénquima mamario (zona adyacente al abdomen). Las muestras fueron inmediatamente fijadas en formol bufferado al 10 % durante aproximadamente 8 hs a temperatura ambiente (T.A.). Para su procesamiento mediante técnicas histológicas de rutina, luego de un lavado prolongado en agua corriente y PBS 0,01M pH 7,2, las muestras se deshidrataron en concentraciones graduales crecientes de alcohol etílico, aclararon en xilol y embebieron en parafina siguiendo protocolos de rutina (Woods y Ellis, 1994). Posteriormente, se realizaron cortes seriados de aproximadamente 4 μ m en un micrótopo rotativo manual y se los dispuso sobre portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Por último los cortes fueron secados a 37°C durante 24 hs y luego almacenados a 4°C hasta su utilización en técnicas inmunohistoquímicas (IHQ).

Paralelamente al procesado de las muestras para IHQ, se realizó un *pool* de pequeñas porciones de las distintas zonas del tejido mamario extraído y luego fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para su posterior uso en técnicas de Biología Molecular.

3.7. Inmunohistoquímica sobre muestras de tejido mamario

En la tabla 1 se detallan los anticuerpos utilizados y las concentraciones de uso para cada uno. Para todos los antígenos se utilizó el método streptavidina-biotina-inmunoperoxidasa según descripciones previas (Baravalle y col., 2007), con algunas variantes específicas en el procedimiento según el anticuerpo utilizado. Brevemente, las secciones de tejido provenientes de las distintas zonas obtenidas fueron desparafinadas, hidratadas y tratadas con recuperación antigénica o no, dependiendo del anticuerpo primario utilizado. La actividad de la peroxidasa endógena fue inactivada con 1% de H₂O₂ y las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero normal de cabra al 10%. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario 18 hs a 4°C, excepto para las inmunomarcaciones con anti-CD14 y TNF- α que fueron incubadas a T.A., y luego por 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado a T.A., seleccionado específicamente de acuerdo a los dos tipos de anticuerpos primarios utilizados

(monoclonal o policlonal). Ambos anticuerpos se diluyeron en PBS-BSA. La visualización del antígeno se realizó por el método streptavidina-peroxidasa (BioGenex, San Ramón, CA) utilizándose como cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Por último, los cortes fueron lavados en agua destilada, contracolorados con hematoxilina (Biopur, Bubendorf, Suiza), deshidratados y montados.

3.7.1. Controles de la técnica

Para verificar la especificidad de la técnica utilizada se realizaron diferentes controles:

Como control negativo se reemplazó el anticuerpo primario por suero no inmune de conejo y ratón, omisión del anticuerpo primario y omisión del anticuerpo secundario biotinilado. Para excluir la posibilidad de la no supresión de la actividad de la peroxidasa endógena algunas secciones fueron incubadas solamente con el reactivo DAB. La especificidad de los anticuerpos usados se determinó mediante western blot como se detalla más adelante.

3.7.2. Procedimiento general de IHQ indirecta

1. Colocación de los cortes 10 minutos en la estufa a 60°C
2. Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.
3. Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de alcohol etílico absoluto (dos pasajes de 3 minutos), alcohol etílico 96° (un pasaje de 3 minutos) y finalmente alcohol etílico 70° (un pasaje de 3 minutos).
4. Lavado en PBS pH 7,2 durante 5 minutos
5. Tratamiento de Recuperación antigénica (a).
6. Lavados en PBS (de 5 minutos cada uno)
7. Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa. Solución de H₂O₂ (b) en metanol durante 20 minutos (10+10).
8. Lavados en PBS (de 5 minutos cada uno).
9. Bloqueo de los sitios de unión no-específicos con Solución de Bloqueo (c) durante 15 minutos en cámara húmeda.
10. Escurrido del exceso de solución y sin lavar cubrirlo con el anticuerpo primario, de acuerdo al procedimiento correspondiente. Incubación en cámara húmeda durante toda la noche (O.N.) y a la temperatura correspondiente, según el anticuerpo utilizado (tabla 1).
11. Lavados en PBS (de 5 minutos cada uno).
12. Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos. Incubar en cámara húmeda.
13. Lavados en PBS (de 5 minutos cada uno).

14. Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa lista para usar, durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
15. Lavados en PBS (de 5 minutos cada uno).
16. Revelado de la reacción con 3,3-diaminobencidina (DAB). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo.
17. Lavados en agua destilada (de 5 minutos cada uno).
18. Coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur) diluida 1:2 en agua destilada, 5 a 30 segundos.
19. Lavados en agua destilada
20. Virado en agua corriente.
21. Deshidratación y montaje con Bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

(a) Recuperación antigénica

En microondas:

Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 1200 W). Como solución se usó Buffer Citrato 0,01M pH 6,0, en el cual se sumergió los cortes y se calentaron durante 3 minutos a 100% de potencia y luego durante 12 minutos a 40%, enfriándose 20 minutos dentro del microondas apagado.

Digestión con Tripsina (Zymed Digest-All Cat No. 00-3006):

Luego de bloquear la peroxidasa endógena en el protocolo de IHQ, los preparados fueron lavados en agua destilada y se aplicó la enzima por 10 minutos a 37°C. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos c/u en PBS y se prosiguió con el protocolo de IHQ.

(b) Solución de H₂O₂:

Se preparó con 36 ml de metanol y 4 ml de H₂O₂ para 10 portaobjetos dorso con dorso en el coplin. A los 10 minutos se agregaron 4 ml adicionales de H₂O₂.

(c) Solución de Bloqueo:

ANEXO I (Página 150).

Tabla 1: Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, diluciones de uso, tipo de recuperación antigénica empleada, modo de incubación del anticuerpo primario y procedencia del mismo.

	Origen	Dilución	Recuperación Antigénica (RA)	Incubación	Procedencia
<i>Anticuerpos primarios</i>					
PCNA (Clon PC-10)	Ratón	1:100	Microondas	O.N. a 4°C	Novocastra laboratorios, Newcastle, UK
TNF- α (-Policlonal)	Conejo	1:150	Sin RA	O.N. a T.A.	Chemicon, San Francisco, CA
IL-1 α (Policlonal)	Conejo	1:100	Microondas	O.N. a 4°C	Endogen, Woburn, USA
IL-6 (Clon 77830)	Ratón	1:200	Microondas	O.N. a 4°C	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD14 (Clon RPA-M1)	Ratón	1:30	Enzimática (Tripsina)	O.N. a T.A.	Zymed, San Francisco, CA
<i>Anticuerpos secundarios</i>					
Anti conejo IgG	Cabra	1:200		30 min a T.A.	LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.
Anti ratón IgG	Cabra	1:50		30 min a T.A.	LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.

3.8. Análisis digital de imágenes

Se obtuvieron imágenes de cada cuarto mamario utilizado en el ensayo con el EPg, mediante una cámara de video color CCD Moticam 2000 (Mikron Instrument Inc., California, USA) montada en un microscopio convencional Olympus CX31, (Olympus Co., Japón) usando un objetivo 40X. Se digitalizaron campos microscópicos que cubrieron toda el área a analizar y se almacenaron bajo el formato TIFF con una definición de 1200 x 1600 pixels y 24 bits de color. Se realizó el análisis de las imágenes utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). A la magnificación usada, cada píxel de la imagen correspondía a 0,13 μm , y cada campo representaba un área de tejido de 0,032 mm^2 .

3.9. Cuantificación de la IHQ

3.9.1. Evaluación y cuantificación de la proliferación celular

La proliferación celular se evaluó a través de la inmunomarcación de PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular). PCNA es una proteína de 36 kDa, la cual está altamente conservada entre especies. El PCNA funciona como un cofactor de la ADN polimerasa- δ tanto en la fase S del ciclo celular como así también en la síntesis de ADN asociado con los mecanismos de reparación del daño del mismo.

Todas las células inmunomarcadas para PCNA se consideraron positivas. Estas presentaron reacción nuclear positiva con alta heterogeneidad en la intensidad de la tinción. Por ello, mediante el análisis de las imágenes almacenadas, se establecieron tres rangos de intensidad: débil (+), moderado (++) e intenso (+++). Se contaron en cada preparado, como mínimo 2000 células epiteliales alveolares en 40X, sin considerar células mioepiteliales, en un mínimo de 20 campos. Sólo se cuantificaron las que mostraron la tinción nuclear más intensa (PCNA +++) y el resultado se expresó como porcentaje de estas células intensamente marcadas.

3.9.2. Evaluación de la inmunidad innata

3.9.2.1. Cuantificación de la inmunoexpresión de citoquinas

Se evaluó a través de la expresión de TNF- α , IL-1 α , IL-6, citoquinas que forman parte de la inmunidad innata, producidas en mayor cantidad por macrófagos, en respuesta a su estimulación por PAMPs, otras citoquinas y componentes del complemento. Estas tres citoquinas median un conjunto de acciones tendientes al desarrollo de un cuadro inflamatorio local y sistémico, denominado reacción de fase aguda, que intenta resolver el proceso infeccioso con la eliminación de su agente causal (Fainboim y Geffner, 2008).

El método de cuantificación de niveles de expresión aquí utilizado se detalla en trabajos previos (Baravalle y col., 2007; Dallard y col., 2009). Brevemente, el área inmunomarcada por la reacción de los anticuerpos, fue calculada como porcentaje del área total evaluada a través de análisis de segmentación de colores, localizando todos

los objetos de color específico dado por el cromógeno utilizado (marcación marrón). La marcación marrón fue seleccionada con una sensibilidad de 4 (máximo 5) y luego se aplicó una máscara para separar los colores de forma permanente. El porcentaje de área inmunomarcada fue calculado para al menos 40 imágenes en cada una de las siguientes estructuras: alvéolos, conductos y tejido intersticial. La inmunomarcación de TNF- α , IL-1 α , IL-6 se cuantificó utilizando la metodología antes descrita.

3.9.2.2. Cuantificación de monocitos-macrófagos mediante la expresión de CD14

Los CD ó (“*cluster* de diferenciación”) que significa “grupo de diferenciación”, son proteínas estructurales de membrana clasificadas en series de superfamilias. Cada superfamilia se caracteriza porque las proteínas que la integran reúnen una serie de características estructurales en común. Normalmente, estas características estructurales comunes significan que comparten dominios de proteína de un determinado tipo. El CD14 es un marcador principalmente de monocitos-macrófagos y en segunda medida de LPMN. Es un co-receptor para LPS bacteriano, prácticamente ausente en los granulocitos (Fainboim y Geffner, 2008).

Para analizar la expresión de CD14 en el tejido mamario, se digitalizaron imágenes de todo el preparado sometido a IHQ en un aumento de 40X y se calculó la cantidad de células positivas por unidad de área (mm²).

3.10. Western blot a partir de muestras de leche y tejido mamario provenientes del ensayo con el EPg.

3.10.1. Preparación de muestras para western blot

Debido a que se obtuvieron valores similares en el RCS de muestras tratadas con placebo y control, la técnica de western blot en leche fue realizada solamente en aquellas muestras provenientes de la inoculación con EPg y placebo. Las mismas fueron centrifugadas a 12000 *g* a 4°C durante 30 minutos para la obtención de suero. Luego de eliminar la capa de grasa formada, se centrifugó nuevamente durante 30 minutos a la misma velocidad y al sobrenadante translúcido obtenido se lo almacenó a -80°C.

Con respecto a las muestras de tejido mamario provenientes de todos los cuartos en estudio, se llevó a cabo la homogenización de las mismas en hielo (60 mg aproximadamente), mediante el agregado de inhibidores de proteasas (Complete Mini: Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Cat N° 36153001 –ROCHE) y buffer RIPA para homogenización (Anexo I). La técnica se realizó con un Homogenizador T10 basic Ultra Turrax (IKA WERKE GMBH & CO. KG, Staufen, Alemania).


Una vez obtenido el suero de la leche y el extracto proteico de tejido se midió la concentración de proteínas de cada tipo de muestra mediante el método fluorimétrico Quant-iT™ Protein Assay Kit (Qubit™, Invitrogen, Oregon, Estados Unidos). Previamente a las lecturas, se utilizó un patrón de referencia para realizar la curva de calibrado.

3.10.2. Corrida electroforética y electrotransferencia

Las proteínas provenientes de tejido y leche fueron separadas por electroforesis desnaturante (PAGE-SDS) en condiciones reductoras en geles discontinuos al 15 % de poliacrilamida. Las muestras fueron diluidas en buffer de muestra para SDS-PAGE e incubadas en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron separadas electroforéticamente junto a los marcadores de peso molecular (PM, Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324, BIO-RAD) cuyas proteínas se detallan en la tabla 2. Se utilizó una cuba vertical de Bio-Rad (California, USA) sembrando los volúmenes adecuados para 40 µg de proteínas (para las muestras de leche) y 80 µg de proteína (para las muestras de tejido) y realizando una corrida electroforética durante 50 minutos a 25 mA para el gel de apilamiento y luego durante 80 minutos a 50 mA para el gel de resolución. Se utilizó el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS pH 8,3.

Luego de finalizada la corrida se procedió a la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham-GE Healthcare-Argentina), para lo cual se utilizó el buffer de transferencia Towbin modificado compuesto por Tris-Glicina con 20 % de metanol. Se realizó la transferencia en frío a 100 V durante 150 minutos. Al término de este periodo se coloreó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para ver la efectividad de la transferencia. Con el mismo sentido se coloreó el gel con Coomassie Brilliant Blue 250G.

Tabla 2: Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324. BIO-RAD.

	Proteína	Peso molecular kDa
	Miosina	195
	β-galactosidasa	131
	Albúmina sérica	85
	Anhidrasa carbónica	40
	Inhibidor de tripsina	31,53
	Lisozima	17,25
	Aprotinina	6,75

3.10.3. Inmunodetección para determinar la especificidad de los anticuerpos utilizados en IHQ. Inmunodetección de TNF- α en muestras de leche y de tejido mamario.

Las membranas obtenidas de las muestras de leche fueron bloqueadas para evitar uniones inespecíficas, con TBS-Tween-BSA 3%, durante 3 hs a T.A. en agitación, en cambio, las membranas obtenidas de las muestras de tejido fueron bloqueadas con TBS-Tween-Leche 5%, durante 2 hs, 30 minutos a T.A. Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución de los anticuerpos detallados en la tabla 3, preparada en buffer de bloqueo. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TBS-Tween y luego se incubó la membrana con una dilución del anticuerpo secundario en solución de bloqueo por 2 hs a 25 °C. Luego de realizar lavados con TBS-Tween se detectó la señal específica por quimioluminiscencia, (Sistema ECL Plus, GE Healthcare). Las membranas fueron expuestas a una placa radiográfica (ECL, GE Healthcare) durante 15 a 30 segundos. El revelado de la placa se realizó en forma manual utilizando soluciones de revelador y fijador (Kodak, Rochester, N.Y., USA). Las placas radiográficas fueron escaneadas a 600 dpi (scanner HP Officejet J5780) y las imágenes obtenidas fueron almacenadas con formato Tiff. Para la cuantificación de TNF- α en muestras tanto de leche como de tejido mamario, se analizó la densidad óptica integrada (DOI) de las bandas obtenidas con el programa Image- Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetics).

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en la técnica de western blot.

Proteína	Anticuerpo	Origen	Dilución	Procedencia
TNF- α	Anti- TNF- α	Policlonal	1:150	Chemicon
IL-1 α	Anti-IL-1 α humana	Policlonal	1:50	Endogen
IL-6	Anti-IL-6 porcina (Clon 77830)	Monoclonal	1:50	R&D Systems

3.11. Extracción de ARN total a partir de muestras de leche provenientes del ensayo con el EPg

El ARN total fue aislado del pellet de células somáticas provenientes de leche de animales inoculados con el EPg, placebo y glándulas mamarias no inoculadas (controles). Para ello el método elegido fue el del reactivo Trizol LS Reagent (Invitrogen) que consistió en homogeneizar el pellet formado en 1 ml de reactivo e incubar 5 min a 25°C. El ARN total se extrajo a partir del sobrenadante obtenido con cloroformo (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania), previa agitación vigorosa e incubando 15 min a 4°C. Se centrifugó a 12000 g para separar la fase acuosa de la orgánica. Posteriormente se precipitó el ARN con un volumen equivalente de alcohol isopropílico (Merk KGaA) incubando por 30 min a -20°C y se separó por centrifugación a 12000 g. El ARN obtenido se lavó con etanol 75% por 10 min a 4°C, se redisolvió con agua DEPC (0,1%) precalentada a 60°C y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. La concentración de ARN se obtuvo siguiendo la fórmula detallada a continuación:

$$\text{Concentración de ARN } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs}_{.260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{dilución}^{-1}$$

3.12. Transcripción reversa (RT) y análisis de la expresión de citoquinas mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

3.12.1. RT de ARN total proveniente de muestras de leche

A los efectos de eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico, se realizó un tratamiento con ADNasa (Invitrogen). La composición final del medio de reacción fue: ARN (1,2 µg), buffer de la enzima ADNasa I (1X), enzima ADNasa I (0,1 UI/µl), agua DEPC (0,1%) cantidad suficiente para llegar a un volumen final de reacción de 12 µl. La reacción de tratamiento de ADNasa se llevó a cabo incubando a 20°C durante 15 min, luego se inactivó la enzima con EDTA (2,3 mM) y se incubó 10 min a 65°C.

Para la transcripción reversa primeramente se preparó una solución “master mix” conteniendo cada uno de los reactivos en las siguientes concentraciones finales: cebadores con secuencia al azar (12,5 ng/µl), dNTPs (0,5 mM de cada uno), buffer de la enzima MMLV (1X), DTT (10 mM), inhibidor de ribonucleasas ARNasaOut (1UI/µl) y la enzima MMLV Reverse Transcriptase (10 UI/µl) (Invitrogen), y se adicionó una cantidad constante de ARN tratado con ADNasa (11,85 µl) (Cantiello y col., 2007). Las condiciones utilizadas para la transcripción reversa fueron 10 min a 25°C para el anillado, 50 min a 37°C para la síntesis del ADN copia (ADNc) y 15 min a 70°C para la inactivación de la enzima. Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 20 µl utilizando termociclador (TECHNE TC-312, Stone, Reino Unido).

La concentración de ADN simple cadena (ADNsc) obtenida fue cuantificada por un método fluorimétrico Quant-iT™ ssDNA Assay Kit (Qubit™, Invitrogen) con el objeto de utilizar luego una cantidad constante para la técnica de amplificación del ADN (PCR) para cada par de cebadores.

3.12.2. Caracterización de la síntesis de citoquinas por PCR

Para la realización de PCRs con el objetivo de caracterizar y cuantificar la expresión de citoquinas, se utilizaron cebadores diseñados según datos publicados (Riollet y col., 2001) y analizados mediante el programa de bioinformática LASERGENE (DNASstar, WI, USA).

Para la estandarización de cada PCR se probaron distintas temperaturas de hibridación de los mismos y se analizó la cinética variando el número de ciclos de amplificación para determinar el número óptimo para cada par de cebadores utilizado, teniendo en cuenta que los productos de la PCR fueran obtenidos en la zona de fase exponencial de amplificación y de linealidad con respecto a la concentración inicial del ARN de partida.

Debido a que se obtuvieron valores similares en el RCS de muestras tratadas con placebo y control, las RT-PCR fueron realizadas solamente para muestras de leche provenientes de la inoculación con EPg y placebo.

3.12.3. Controles

Como control interno se utilizó un gen cuya expresión fuera constitutiva y que permitiera cuantificar mediante comparación con este último la expresión de las distintas citoquinas. Se realizaron pruebas con los cebadores para distintos genes normalizadores descritos en la tabla 4.

Tabla 4: Lista de cebadores utilizados como genes normalizadores y condiciones óptimas de trabajo.

Gen Normalizador	Secuencia de cebadores (5'-3') S: sentido; AS: antisentido	Amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)	Nº de ciclos de amplificación	Nº de acceso en GenBank
β -actina	A: CGGAACCGTCATTG CC AS:ACCCACACTGTGCCCATCTA	290	58 °C	31	BT030480
Ubiquitina	A:AGATCCAGGATAAGGAAGGCAT AS:GCTCCACCTCCAGGGTGAT	198	52 °C	31	Z18245
GAPDH	A: CACCCTCAAGAT TGCAGCA AS:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	103	52 °C	31	BC102589
18 S	A:TCAAGAACGAAAGTCGGAGG AS:GACATCTAAGGGCATCACA	493	52 °C	35	DQ222453

Paralelamente, se realizaron para cada par de cebadores utilizados para la caracterización de citoquinas, controles negativos que consistieron en amplificar los mismos ARNs totales extraídos pero omitiendo la fase de Transcripción reversa (RT).

3.12.4. Procedimiento general de la técnica

Las PCR se llevaron a cabo resuspendiendo la muestras de ADNc en una “master mix” conteniendo cada uno de los reactivos en las siguientes concentraciones finales: agua bidestilada, MgCl₂ (1,5 mM), cebador sentido (0,5 μM), cebador antisentido (0,5 μM), dNTPs (0,3 mM de cada uno), buffer Taq (1X) (Invitrogen) y Taq polimerasa (2 UI/μl, Invitrogen). Brevemente, los ADNc fueron sometidos a una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, luego se realizaron ciclos sucesivos de desnaturalización, hibridación y extensión bajo el siguiente protocolo: 94°C 45 seg, temperatura variable de hibridación (según el primer utilizado, ver tabla 5) durante 30 seg, 72°C 1 min 30 seg. Por último, se realizó la extensión final a 72°C por 10 min. Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 25 μl utilizando termociclador (TECHNE TC-312). Un resumen de las condiciones ensayadas y los cebadores para cada citoquina evaluada se detalla en la tabla 5. Paralelamente, se realizaron RT-PCR a partir de muestras de ganglio linfático bovino provenientes de frigorífico, como control positivo para determinar la capacidad de hibridación de los cebadores utilizados en muestras de leche, siguiendo la metodología previamente descrita (Amweg y col., 2010).

Tabla 5: Cebadores utilizados para la detección de citoquinas bovinas en células somáticas de leche y ganglio linfático bovino. Condiciones óptimas de trabajo.

Gen	Secuencia de cebadores (5′-3′) S: sentido; AS: antisentido	Amplificación (pb)	Temperatura de hibridación (°C)	N° de ciclos de amplificación	N° de acceso en GenBank
IL-1 α	S: TGCAAGCTATGAGCCACTTC AS: GCATTCCTGGTGGATGACTC	291	52 °C	33	M37210
IL-1 β	S: TGGGAGATGGAAACATCCAG AS: TTTATTGACTGCACGGGTGC	231	52 °C	30	M37211
IL-2	A: CTA CTCAAGCTCTACGGGG AS: TTGATCTCTCTGGGGTTCAG	248	52 °C	31	M12791
IL-4	A: TGCCCCAAAGAACA CAACTG AS: TTTAGCCTTCCAAGAGGTC	200	52 °C	31	U14160
IL-6	A: TGAAAGCAGCAAGGAGACAC AS: TGACATTTTCCTGATTTCCC	187	52 °C	31	S49716
IL-8	A: ACTGGCTGTTGCTCTCTTGG AS: ACCTGCACAACCTTCTGCAC	260	54 °C	30	S82598
TNF- α	A: AACAGCCCTCTGGTTCAAAC AS: TCTTGATGGCAGACAGGATG	315	54 °C	33	Z14137
INF- α	A: AGCCCAGATGTAGCTAAGGG AS: CTCCAGTTTCTCAGAGCTGC	215	51 °C	31	M29867

3.12.5. Visualización de resultados y análisis de imágenes

Los amplificadores obtenidos de las distintas PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed™ (Biotium, California, Estados Unidos) de manera conjunta con un marcador de pares de bases (Ladder 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) con el objetivo de determinar la especificidad del producto. Las bandas obtenidas fueron visualizadas en el gel con un transiluminador UV (Labnet, Edison, Estados Unidos), se obtuvieron imágenes digitales con una cámara de fotos (Olympus BH-2,) y se realizó el análisis de las imágenes utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetics). Los niveles de ARNm se expresaron como una relación entre la DOI de las bandas de las distintas citoquinas y su correspondiente β -actina. Además, para confirmar la identidad de las bandas observadas en los geles de agarosa, todos los productos de amplificación obtenidos tanto de muestras de leche como de ganglio linfático bovino, fueron enviados para su secuenciación (Macrogen, Seúl, Korea). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit y se compararon con la base de datos GenBank mediante BLASTn.

3.13. Método directo de conteo de células somáticas de leche como alternativa a la citometría de flujo

3.13.1. Animales y diseño experimental

El método directo de conteo de células somáticas, se realizó con el objetivo de identificar distintos tipos celulares mediante la marcación de antígenos con técnicas de IHQ, como alternativa a la citometría de flujo (CF).

Para ello, fueron recolectadas muestras de leche a partir del ordeño de 6 cuartos mamarios de diferentes animales pertenecientes al rodeo experimental de la EEA Rafaela del INTA, con diferentes RCS, dato provisto por el Laboratorio Regional de Servicios Analíticos (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Las muestras fueron seleccionadas a partir de resultados de RCS provistos por el control lechero e identificación de cuartos mamarios con diferentes recuentos, dentro de los animales elegidos, sobre estimaciones realizadas por el test de mastitis California. Las mismas

muestras se utilizaron tanto para la realización del método directo de conteo como para la validación de la misma mediante CF.

3.13.2. Método directo de conteo de células somáticas - Extendidos de leche

Para realizar los extendidos de leche se tomó como modelo la técnica utilizada por Dulin y col., (1982) y Miller y col., (1991). Las muestras de leche (1,5 ml) fueron obtenidas de animales con diferentes RCS, y procesadas mediante el agregado de 1% de formol bufferado, luego se las centrifugó durante 5 minutos a 800 g para retirar la grasa y al pellet formado se lo lavó con PBS 0,01M pH 7,2. Posteriormente, se recolectaron 20 µl del pellet lavado y se lo sembró en forma de gota esparcida sobre un portaobjeto hasta secarse completamente a temperatura ambiente. Por último, los extendidos fueron fijados en metanol según la metodología empleada por Merezhinskaya y col. (2004).

Para evidenciar la presencia y morfología de las células somáticas en los extendidos se realizó la tinción de los mismos con Tinción 15 segundos (compuesta por 3 soluciones: Fijador, Solución 1 (Xanténicos) y Solución 2 (Tiazínicos)) de Biopur.

3.13.2.1 Inmunohistoquímica sobre extendidos de leche

3.13.2.1.1. Detección de células epiteliales

Las citoqueratinas, son constituyentes de los filamentos intermedios, y son el principal componente estructural de las células epiteliales. Corresponden a un grupo de 19 proteínas que se caracterizan por su estabilidad y su baja solubilidad en tampones fisiológicos. Mediante métodos electroforéticos e inmunológicos con anticuerpos monoclonales, se han clasificado en 2 subfamilias: la primera comprende proteínas básicas relativamente grandes (56 a 67 kDa), numeradas de 1 a 8; mientras que la segunda está constituida por proteínas más pequeñas, más acídicas y numeradas de 9 a 19 (Crewther y col., 1983; Steinert y Roop, 1988). Las citoqueratinas de bajo peso molecular (40 kDa) se encuentran en epitelios simples y glandulares, las de peso molecular intermedio en epitelios estratificados y las de alto peso molecular (~ 67 kDa) en epitelios queratinizados (Sawaf y col., 1991).

Como marcador general para la identificación de células epiteliales en los extendidos de leche, se llevó a cabo la técnica de inmunohistoquímica indirecta (IHQ) descrita para tejidos (Baravalle y col., 2006). Se utilizó el anticuerpo primario anti-citoqueratinas, Clone: AE1- AE3 (Dako), con reactividad para las citoqueratinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16 y 19. Básicamente, la técnica empleada fue la misma que para IHQ en tejido descrita en este trabajo (punto 3.7.2), omitiendo los pasos del 1 al 5 y comenzando con el paso 6. La actividad de la peroxidasa endógena fue inactivada con 1% de H₂O₂ y las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero normal de cabra al 10%. Los extendidos fueron incubados con el anticuerpo primario 18 hs a 4°C y luego por 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo secundario biotinilado. Ambos anticuerpos se diluyeron en PBS-BSA. La visualización del antígeno se realizó por el método streptavidina-peroxidasa (BioGenex). El cromógeno empleado fue 3,3-diaminobencidina (DAB) (Dako) y como coloración de contraste se utilizó Hematoxilina (Biopur). Luego se los deshidrató y se los montó con Bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

3.13.2.1.2. Controles de la técnica

Para verificar la especificidad de la técnica utilizada se realizaron diferentes controles:

Como control negativo se reemplazó el anticuerpo primario por suero no inmune de conejo y ratón, omisión del anticuerpo primario y omisión del anticuerpo secundario biotinilado.

3.13.2.2. Toma de imágenes y análisis de las IHQ en extendidos

El análisis cualitativo y cuantitativo de los extendidos de leche se llevó a cabo mediante la digitalización de imágenes tomadas por una cámara de video color CCD Moticam 2000 (Mikron Instrument Inc.) montada en un microscopio convencional Olympus CX31, (Olympus Co.) usando un objetivo 40X. Sobre la base de la morfología del núcleo y la relación núcleo/citoplasma de las células presentes en los extendidos, se identificaron y cuantificaron las distintas clases de poblaciones celulares, dividiéndose en 3 categorías: células epiteliales (AE1-AE3+), leucocitos polimorfonucleares (LPMN)

(neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y leucocitos mononucleares (linfocitos y monocitos-macrófagos).

Para identificar a los neutrófilos se usaron descripciones previas (Geneser, 2007): diámetro entre 12-15 μm , con un núcleo característico dividido en 3-5 lóbulos y citoplasma con numerosos gránulos finos que apenas se pueden resolver con el microscopio óptico. Los eosinófilos fueron identificados por tener un diámetro de 12-15 μm , un núcleo con dos lóbulos grandes unidos por una fina hebra de cromatina y citoplasma casi totalmente cubierto por grandes gránulos muy eosinófilos. Los basófilos fueron identificados por presentar un diámetro de 12-15 μm y un núcleo con 2 ó 3 lóbulos, que puede presentar forma de S y citoplasma presenta con gruesos gránulos que se tiñen fuertemente.

Por otra parte se identificó a los monocitos-macrófagos y a los linfocitos, siguiendo criterios de descripciones previas (Geneser, 2007): los monocitos son estadios inmaduros de los macrófagos. Los macrófagos fueron identificados como células grandes redondeadas con un diámetro entre 15-20 μm . Su citoplasma abundante, con mayor cantidad de vacuolas y gránulos que el monocito. Por último se identificó a los linfocitos como células pequeñas, de un diámetro de unos 7 μm , con un núcleo redondeado que ocupa casi toda la célula.

3.13.3. Citometría de flujo para la validación del método directo

Cincuenta ml de leche provenientes de los cuartos mamarios con diferentes RCS, a los cuales se les realizó el método directo de identificación y conteo de células descripto anteriormente, fueron utilizados en CF para la identificación de antígenos de superficie (análisis de monocitos-macrófagos mediante la detección de CD14) y de antígenos intracelulares (análisis de células epiteliales mediante la identificación de citoqueratinas).

La técnica que se llevó a cabo fue la de marcación indirecta, en donde las células fueron incubadas con un anticuerpo primario y luego se realizó una segunda incubación con anticuerpo secundario conjugado con fluorescente.

3.13.3.1. Detección de antígeno de superficie (expresión de CD14)

La determinación de la expresión de CD14 se realizó incubando 1×10^6 células con anti-CD14 (Zymed, San Francisco, CA) en las condiciones detalladas en la tabla 6, luego se lavaron y se incubaron con anti-mouse-FITC durante 30 min a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron y se resuspendieron en buffer de lavado para CF. Se analizaron 10.000 eventos en el citómetro FACSCanto II (BD Biosciences). Se seleccionó la región R2 que contiene a la población de células CD14+ teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (Side Scatter) vs complejidad citoplasmática o granularidad (Forward Scatter). Como control de la autofluorescencia intrínseca se incluyeron células somáticas provenientes de leche tratadas sólo con diluyente (Riedy, 1997), además se usaron controles de isotipo (Sigma-Aldrich). La región R3 se la consideró a la región de uniones inespecíficas. El análisis de los eventos ocurridos se analizó con el software WinMDI 2.8. (J. Trotter, Scripps Research Institute, CA, USA). Los eventos positivos se definieron como aquellos cuya fluorescencia excedió el 98% del control (Lewis, 1992).

3.13.3.2. Marcación de antígenos intracelulares (citoqueratinas)

La marcación de citoqueratinas intracelulares se realizó mediante el marcado de las mismas con el anticuerpo anti-citoqueratinas AE1-AE3. Para ello 1×10^6 células provenientes de leche de distintos cuartos mamarios, se lavaron, fijaron y permeabilizaron con saponina al 0,1 % en buffer de lavado para CF y se incubaron con anti-AE1-AE3 (Dako) o con el control de isotipo correspondiente, bajo las condiciones detalladas en la tabla 6. Todas las etapas se realizaron a 4°C en buffer de lavado para CF. La marcación con el anticuerpo secundario unido a FITC y el análisis de los eventos con el citómetro de flujo se realizó de la misma manera que para la marcación de antígenos de superficie CD14.

Tabla 6: Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, diluciones de uso, modo de incubación del anticuerpo primario y procedencia del mismo.

	Origen	Dilución	Incubación	Procedencia
<i>Anticuerpos primarios</i>				
Anti-Citoqueratinas Humanas (clon AE1-AE3)	Ratón	1:25	1 hora en hielo	Dako, Glostrup, Dinamarca.
CD14 (clon RPA-M1)	Ratón	1:5	30 min. en hielo	Zymed, San Francisco, CA.
<i>Anticuerpo marcado con FITC</i>				
Anti-ratón Polivalente Inmunoglobulinas (G,A,M)-FITC	Cabra	1:250	1 hora en hielo y al abrigo de la luz.	Sigma, St. Louis, MO, USA.

3.13.4. Análisis de correlación entre poblaciones celulares cuantificadas por IHQ en extendidos y por Citometría de Flujo

Una vez cuantificadas todas las células presentes en los extendidos y diferenciadas en las categorías antes establecidas, se calcularon los porcentajes de cada categoría, se extrapolaron al total de células halladas por el RCS (a partir de los datos iniciales aportados por el RCS) para hallar los valores absolutos de cada tipo celular/ml y se correlacionaron con el porcentaje de células halladas por CF. El estadístico utilizado fue el coeficiente de correlación de Pearson.

Las correlaciones establecidas fueron:

Células AE1-AE3+ (IHQ) vs. Células AE1-AE3+ (CF)

LPMN (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

LPMN y Leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

Leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

3.14. Evaluación estadística

Para el análisis estadístico se utilizaron test estadísticos paramétricos, convenientemente seleccionados de acuerdo con Spiegel (1991) y Norman y Streiner (1996).

Se calculó la media (\bar{X}) como parámetro de tendencia central y el error estándar de la media (SEM) como medida de dispersión.

Con el propósito de evaluar el posible efecto del tratamiento sobre los principales parámetros estudiados mediante las técnicas IHQ y western blot en muestras de tejido mamario se utilizó el Análisis de varianza (ANOVA) de una vía acorde al modelo:

$$Y_{ij} = \mu + (E_T)_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_{ij} : variable respuesta (PCNA, TNF- α , IL-1 α , IL-6, CD14), μ : media general del grupo, $(E_T)_i$: efecto del tratamiento ($i=3$), ε_{ij} : error residual del modelo.

Para el análisis estadístico de los RCC y los resultados de las técnicas de RT-PCR y western blot en muestras de leche en función del tiempo y del tratamiento se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con interacción, según el modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + (E_T)_i + (E_t)_j + (E_T)_i * (E_t)_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} : variable respuesta (Log₁₀RCC; IL-1 α , IL-1 β , IL-8 y TNF- α), μ : media general del grupo, $(E_T)_i$: efecto del tratamiento ($i=3-4$ en RCS, $i=2$ en western blot, $i=2$ en RT-PCR), $(E_t)_j$: efecto del tiempo ($j=4$) y ε_{ijk} : error residual del modelo.

El ANOVA se utilizó para determinar las diferencias significativas entre las medias de los grupos estudiados en los diferentes efectos contemplados en cada modelo. Posteriormente, se utilizó el Test de comparaciones múltiples Duncan para identificar diferencias significativas en los niveles de cada factor (T =tratamiento; t =tiempo).

Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar posibles correlaciones entre las distintas variables estudiadas.

Todos los análisis estadísticos fueron calculados mediante el software SPSS (versión 15.0 para Windows, SPSS Inc. ©). Para el ANOVA se empleó un nivel de significancia de $P < 0,05$, mientras que en el análisis de correlación se trabajó con $P < 0,01$.

3.15. Normas éticas y de bioseguridad

Los procedimientos efectuados con los animales de experimentación fueron realizados de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*, FASS, 1999). Se prestó especial atención en el uso y manejo de residuos de drogas o reactivos potencialmente contaminantes.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos dosis – respuesta

4.1.1. Recuento de células somáticas e inspecciones clínicas

Los resultados del RCS provenientes de leche obtenida de las inoculaciones con dosis de 1, 5 y 10 mg/ml del EPg y placebo se muestran en la figura 5. El perfil del RCS indica un aumento pronunciado a las 24 hs PI para las tres dosis evaluadas. Este recuento permanece elevado hasta el final del muestreo. En cuanto al perfil del RCS observado en muestras inoculadas con placebo, este denota un aumento menor y más lento (48 hs PI) comparado con el del EPg.

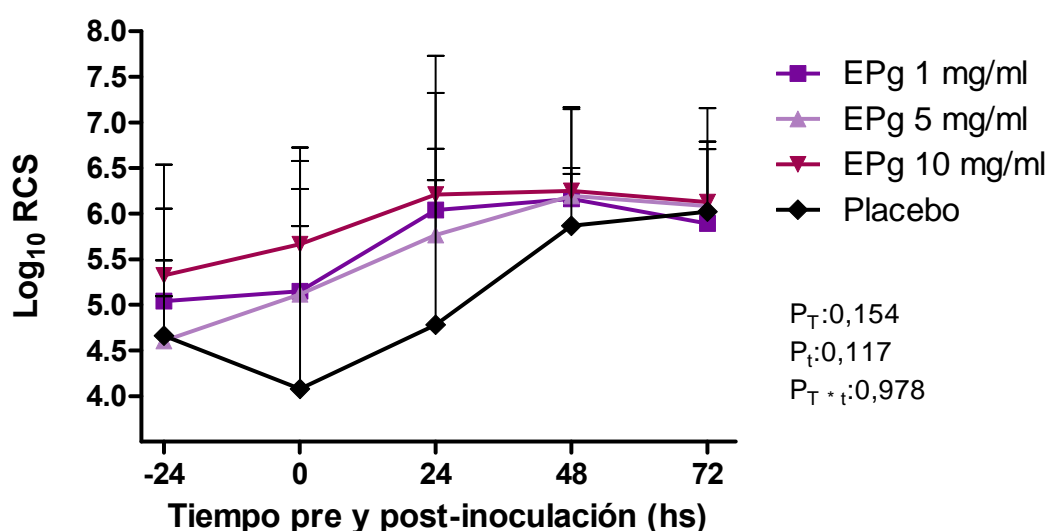


Figura 5: Perfil del recuento de células somáticas (Log_{10} células/ml) del ensayo dosis-respuesta para el EPg (dosis 1, 5 y 10 mg/ml) en relación al periodo de muestreo (hs) (medias \pm SEM). No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos evaluados para los distintos tiempos de análisis ($P_{\text{Tratamiento}} = P_T = 0,154$; $P_{\text{tiempo}} = P_t = 0,117$).

En cuanto a las inspecciones clínicas realizadas en animales involucrados en el ensayo dosis-respuesta, se detectaron cambios macroscópicos en secreción mamaria a las 24 hs PI en cuartos tratados con EPg y también se observó una inflamación moderada en los mismos a las 24 hs PI. Debido a que en el ensayo sólo se incluyeron cuartos libres de IIM, un cuarto inoculado con placebo que resultó positivo al desarrollo bacteriano debió ser descartado del ensayo. Los análisis bacteriológicos para los restantes cuartos arrojaron resultados negativos.

Como los cuartos en los que se inculó la dosis de 10 mg/ml mostraron al comienzo de la experiencia, valores de RCS superiores al resto, independientemente del tratamiento realizado y el RCS entre las dosis 1 y 5 mg/ml fue similar, se optó por elegir una dosis intermedia entre estos últimos valores (3 mg/ml). El perfil del ensayo dosis-respuesta con la dosis de 3 mg/ml se muestra en la figura 6.

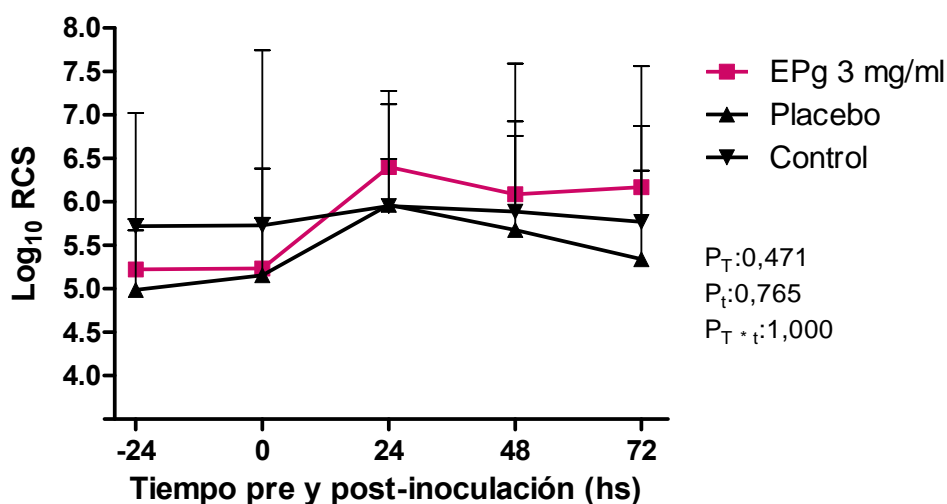


Figura 6: Perfil del recuento de células somáticas (Log₁₀ células/ml) del ensayo dosis-respuesta para el EPg (dosis 3 mg/ml) en relación al periodo de muestreo (hs) (medias ± SEM). No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos evaluados para los distintos tiempos de análisis ($P_T=0,471$; $P_t=0,765$).

A partir del segundo ensayo dosis-respuesta confirmamos que la dosis del EPg a utilizar sería de 3 mg/ml, ya que con esta dosis se observó que el RCS se incrementaba a las 24 hs, aunque no significativamente ($P_T=0,471$), debido tal vez al bajo número de animales utilizado para el ensayo dosis-respuesta. Además, este recuento se mantenía a lo largo del periodo evaluado, mientras que los cuartos con placebo y control mostraron un lento y débil aumento en el RCS a las 24 hs PI, disminuyendo posteriormente.

4.2. Inspecciones clínicas

Los cuartos mamarios tratados con una dosis de 3 mg/ml del EPg mostraron solamente una leve inflamación, detectada por palpación, durante el período experimental y las temperaturas corporales se mantuvieron dentro de los parámetros

normales para la especie. De los análisis bacteriológicos, se encontró que todas las muestras analizadas resultaron negativas al desarrollo bacteriano.

4.3. Recuento de células somáticas

Los resultados del RCS provenientes de leche obtenida de las inoculaciones con una dosis de 3 mg/ml del EPg, placebo y control se muestran en la figura 7.

Los valores obtenidos demuestran un incremento significativo en el RCS en los cuartos tratados con el EPg, en donde a las 24 hs PI se alcanzó un recuento con un valor de $\log_{10} 6.84 \pm 0.11$ células/ml. Un pico en el RCS se observó a las 72 hs PI ($\log_{10} 6.92 \pm 0.07$) para el mismo tratamiento. En cambio, el RCS para los grupos placebo y control mostró un leve incremento a lo largo del periodo de muestreo, alcanzando los mayores valores a las 72 hs PI. El RCS fue significativamente mayor a las 24, 48 y 72 hs PI en todos los cuartos con EPg en comparación con cuartos controles y tratados con placebo ($P_T < 0,001$; $P_t < 0,001$). Además, se encontró interacción significativa para los dos factores analizados (Tratamiento=T * tiempo=t) ($P_{T * t} < 0,001$) (Anexo III).

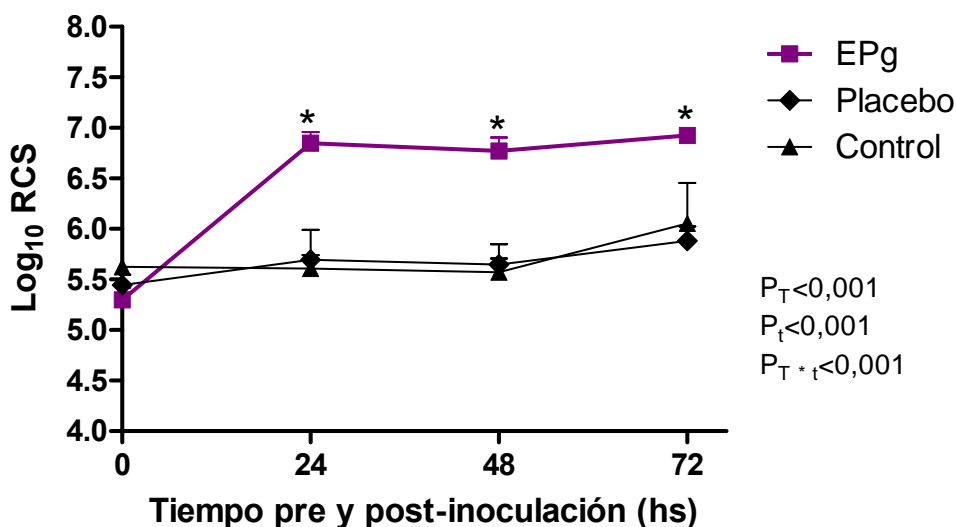


Figura 7: Perfil del recuento de células somáticas (Log₁₀ células/ml) para cada tratamiento en relación al periodo de muestreo (medias ± SEM). * Indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

4.4. Inmunohistoquímica sobre muestras de tejido mamario

4.4.1. Proliferación celular

La proliferación celular en glándulas mamarias inoculadas con el EPg, placebo y glándulas controles se evaluó mediante la expresión de PCNA nuclear en el estroma y parénquima mamario. El porcentaje de células inmunomarcadas con PCNA en el estroma y parénquima de los diferentes grupos estudiados se grafica en la figura 8.

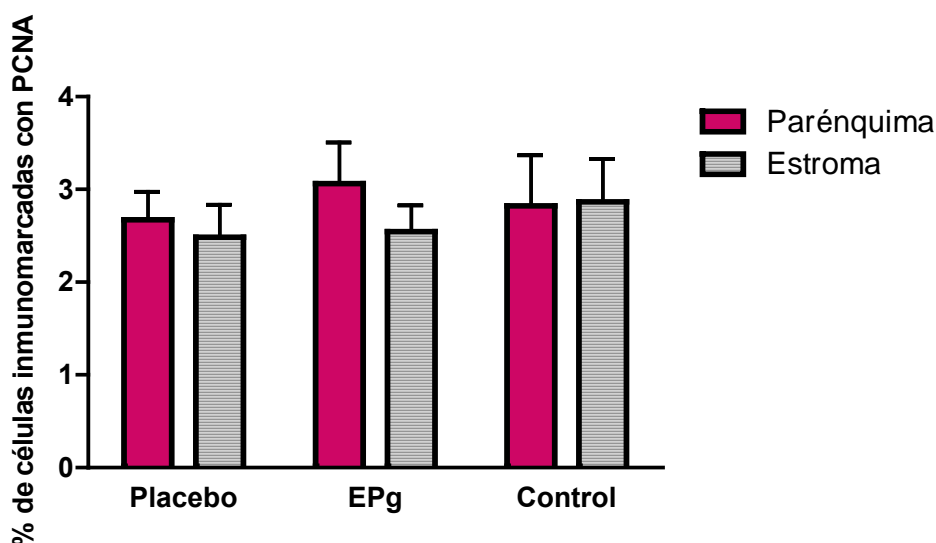
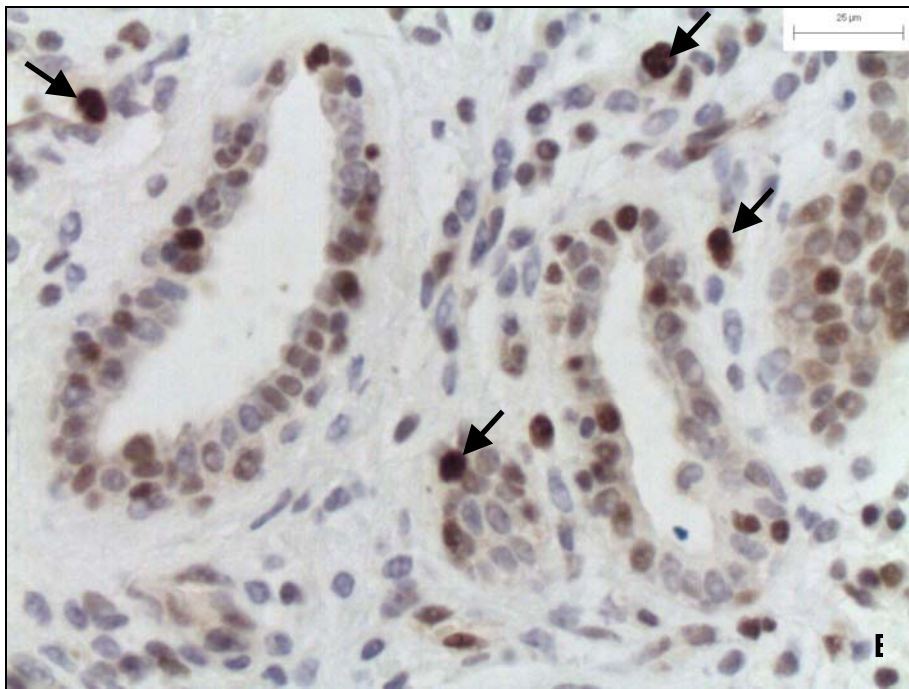
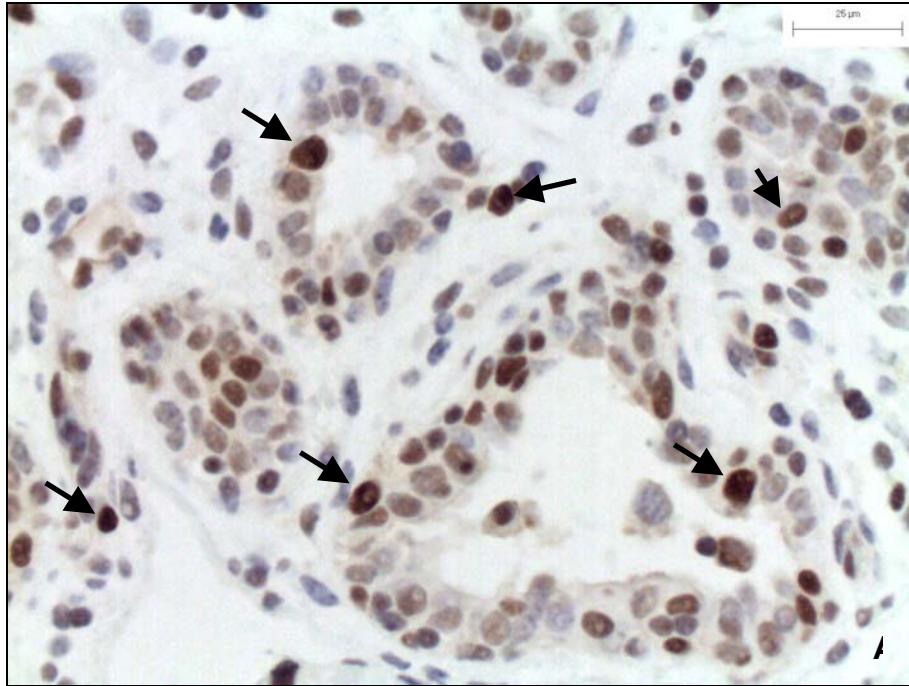


Figura 8: Porcentaje de células inmunomarcadas con PCNA en parénquima y estroma mamario de los distintos tratamientos. Las barras representan las medias de los porcentajes de células inmunomarcadas entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM.

El porcentaje de células inmunopositivas para PCNA en los tres tratamientos, se vio levemente aumentado en el parénquima en comparación al estroma al día 7 del secado. Tanto en el parénquima mamario como en el estroma, la proliferación celular se mantuvo constante en los tres grupos estudiados, con un leve aumento del índice de proliferación en el parénquima en los cuartos tratados con el EPg (figura 9). No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de proliferación celular entre las tres zonas evaluadas ($P > 0,05$). No se obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes de proliferación celular entre los tres grupos evaluados, tanto en el parénquima ($P = 0,810$) como en el estroma mamario ($P = 0,777$).



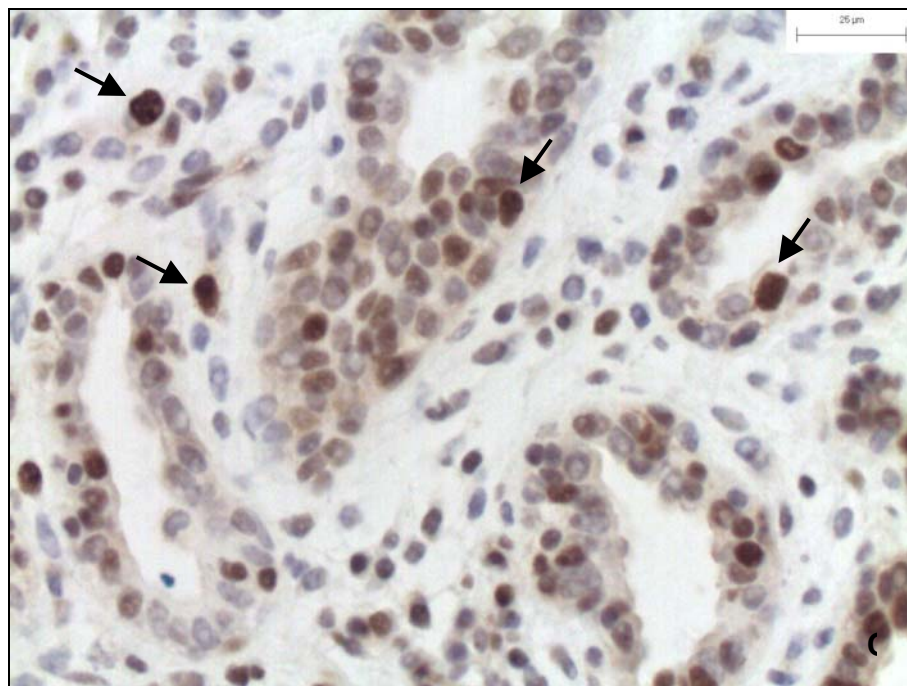


Figura 9: Inmunomarcación con PCNA en glándula mamaria bovina a los 7 días del secado. Las flechas indican células PCNA intensamente positivas (+++). **A:** glándula mamaria inoculada con el EPg; **B:** glándula mamaria inoculada con placebo; **C:** glándula mamaria control.

4.4.2. Inmunidad innata por inmunohistoquímica

4.4.2.1. Cuantificación de la inmunoexpresión de citoquinas

Para cada citoquina evaluada, se realizó el análisis de inmunomarcación citoplasmático con cada anticuerpo a través de la detección del cromógeno y se evaluó mediante el análisis de segmentación de colores. Luego se calcularon los porcentajes del área inmunopositiva. Diferencias regionales en la distribución y área de inmunomarcación para cada citoquina fueron evaluadas dentro de la glándula mamaria.

4.4.2.1.1. Inmunomarcación para $TNF-\alpha$

La expresión de $TNF-\alpha$ en glándula mamaria tratada con el EPg, placebo y controles se vio localizada en el parénquima y estroma mamario, principalmente en el citoplasma de las células epiteliales y de conductos excretores. Además, se encontraron células del sistema inmune en estos tejidos, como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos intraepiteliales, cuyo citoplasma reaccionó intensamente con el anticuerpo

utilizado, al igual que los endotelios y fibras musculares lisas de los vasos sanguíneos (figuras 10, 11 y 12).

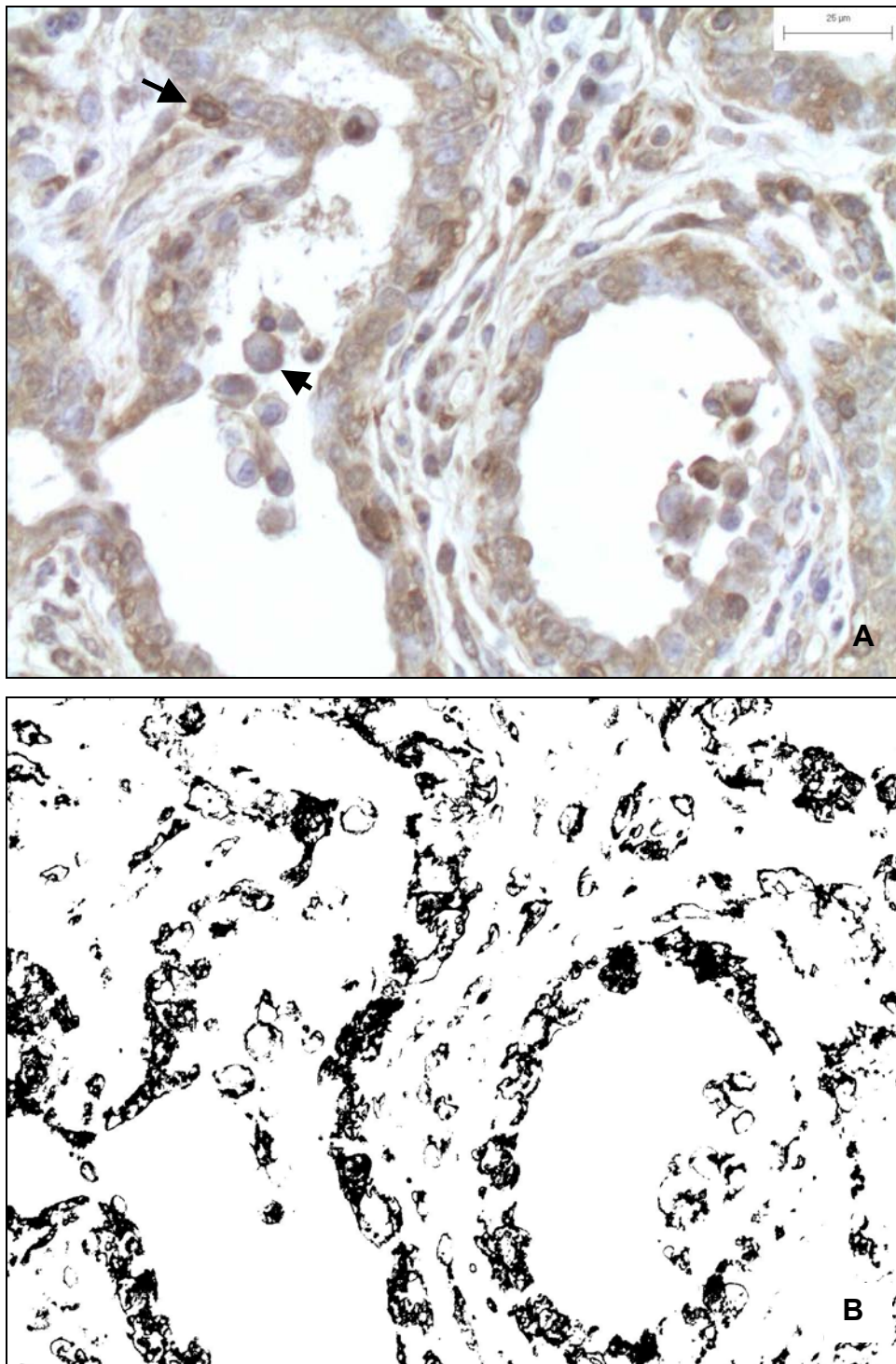


Figura 10: Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria inoculada con el EPg a los 7 días del secado. Marcación intensa (3+) del citoplasma de las células epiteliales que tapizan los alvéolos y conductos mamarios. Marcación intensa (3+) del citoplasma de macrófagos (flechas) (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

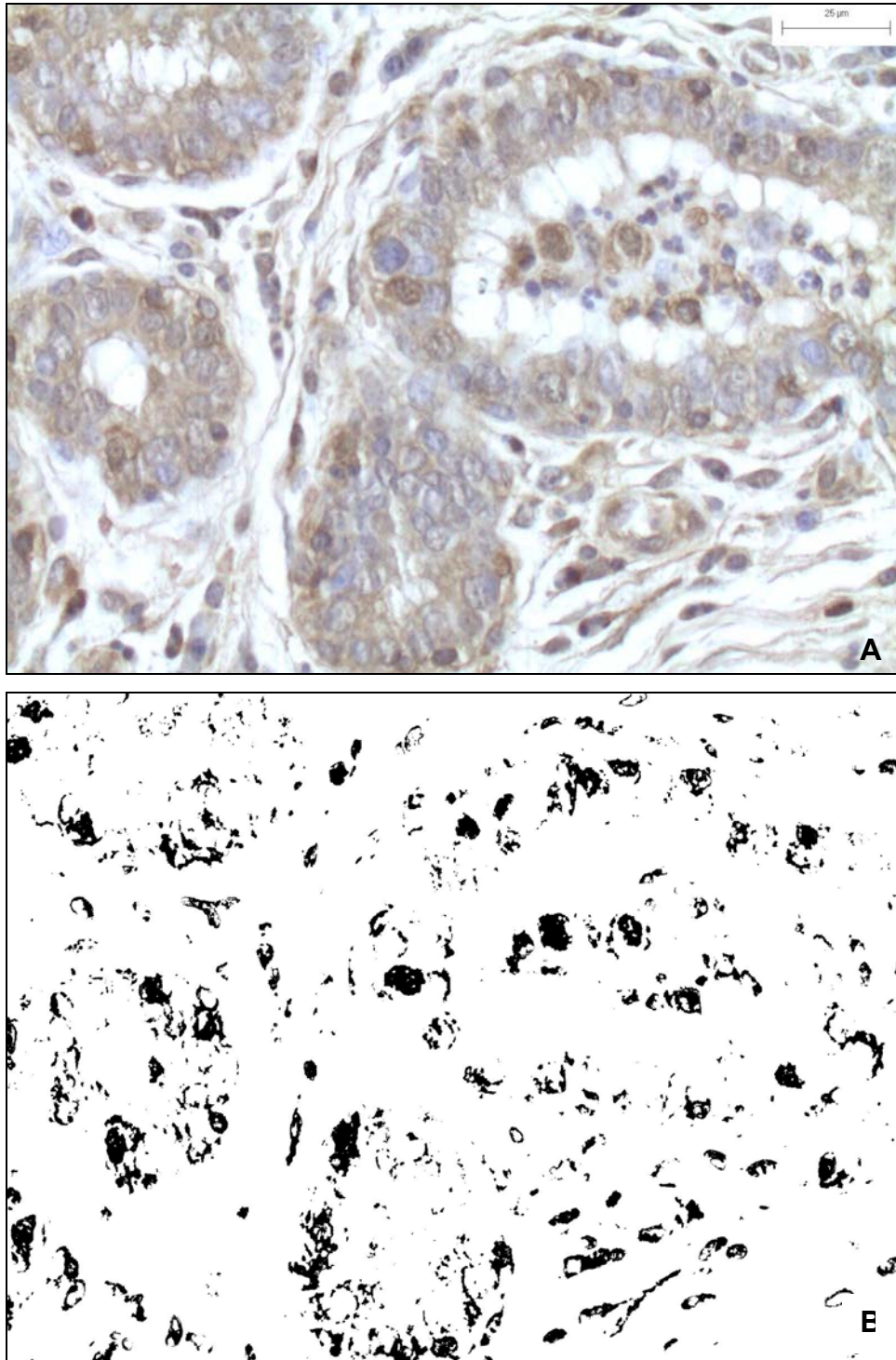


Figura 11: Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria inoculada con placebo a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

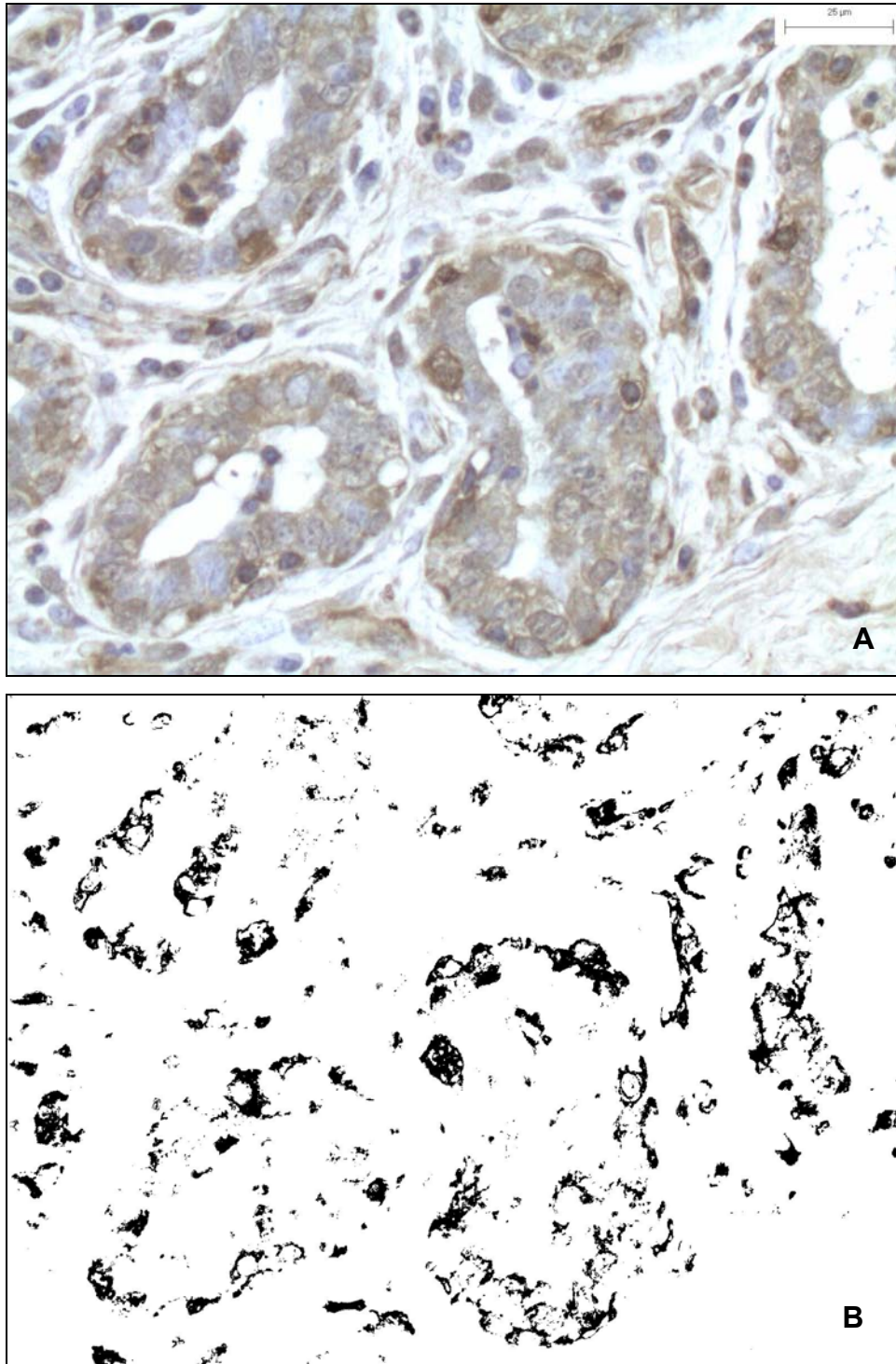


Figura 12: Inmunomarcación para TNF- α en glándula mamaria control a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

En la figura 13 se grafican los porcentajes de inmunomarcación para TNF- α en las distintas zonas de los diferentes tratamientos estudiados.

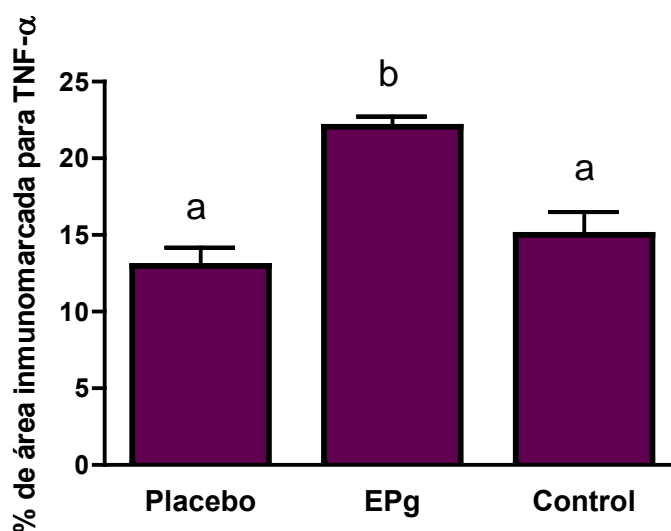


Figura 13: Porcentaje de área inmunomarcada para TNF- α en glándula mamaria bovina para los distintos tratamientos. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM. Diferentes letras denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α entre las tres zonas evaluadas ($P > 0,05$). Los porcentajes de área inmunomarcada para TNF- α en el grupo tratado con el EPg, fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) a los hallados en los grupos placebo y control. Cabe aclarar que entre los grupos placebo y control no se obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes de inmunoexpresión de la citoquina aquí evaluada.

4.4.2.1.2. Inmunomarcación para IL-1 α

La expresión de la IL-1 α se observó en los tejidos mamaros de los tres grupos evaluados y se asoció principalmente a estructuras del parénquima mamario, variando de débil a intensa. El citoplasma de las células epiteliales alveolares y de los conductos excretores reaccionó intensamente a la inmunomarcación. Por otra parte, diferentes células del estroma mamario como macrófagos, leucocitos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos también presentaron reacción positiva. El tejido conectivo del estroma intralobulillar e interlobulillar resultó negativo a la inmunomarcación (figuras 14, 15 y 16).

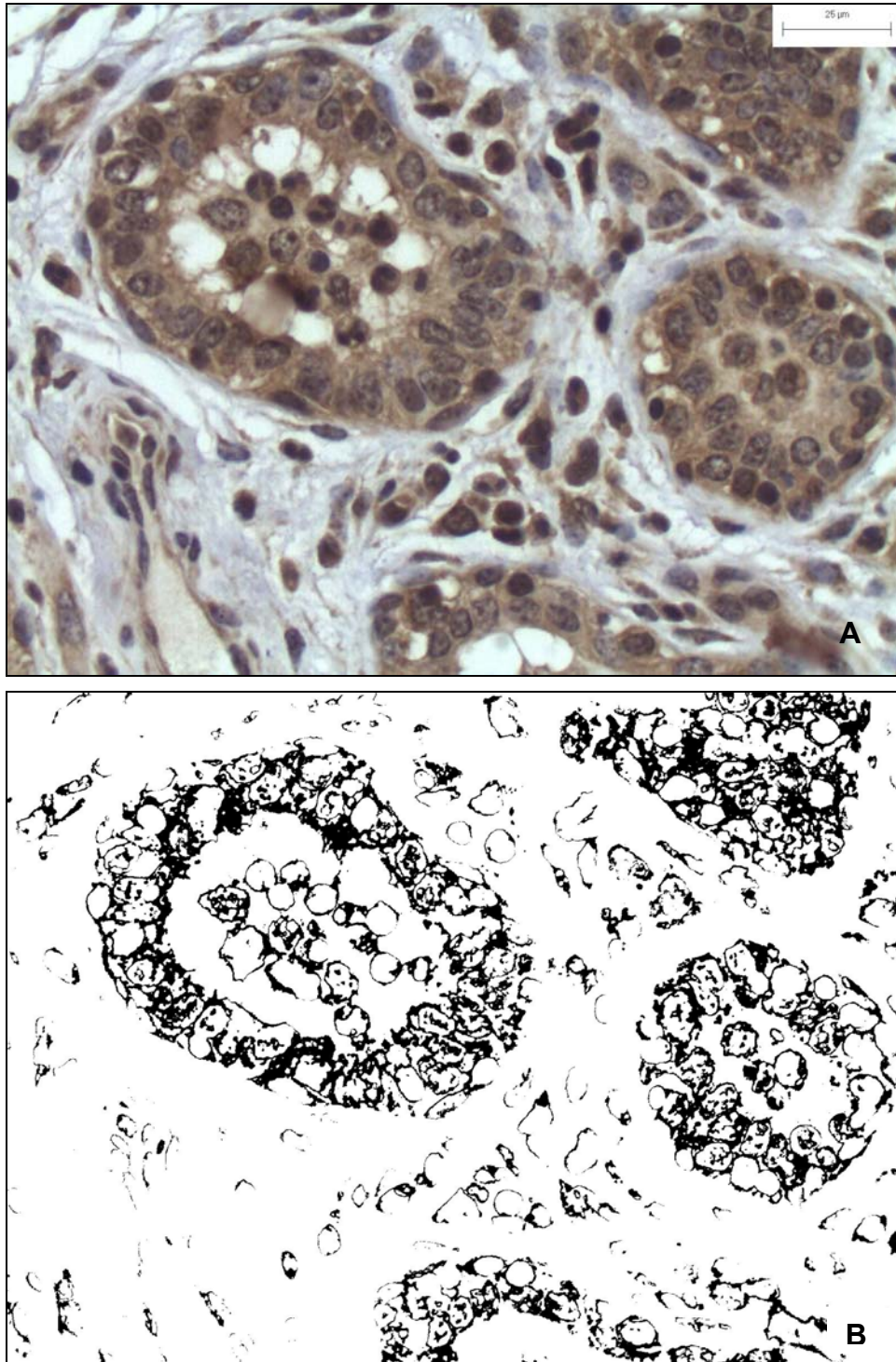


Figura 14: Inmunomarcación para IL-1 α en tejido de glándula mamaria bovina inoculada con el EPg a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

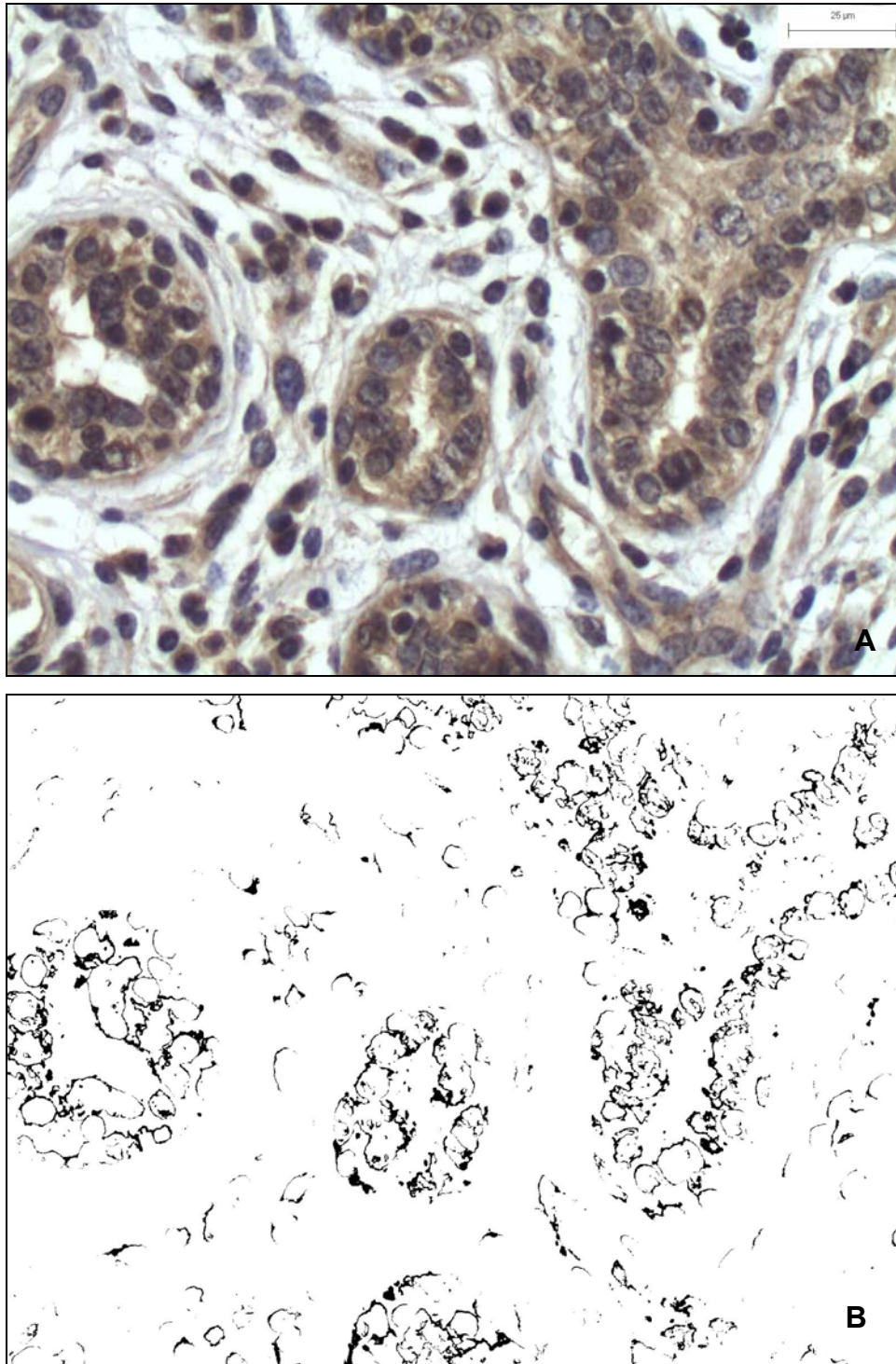


Figura 15: Inmunomarcación para IL-1 α en tejido de glándula mamaria bovina inoculada con placebo a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

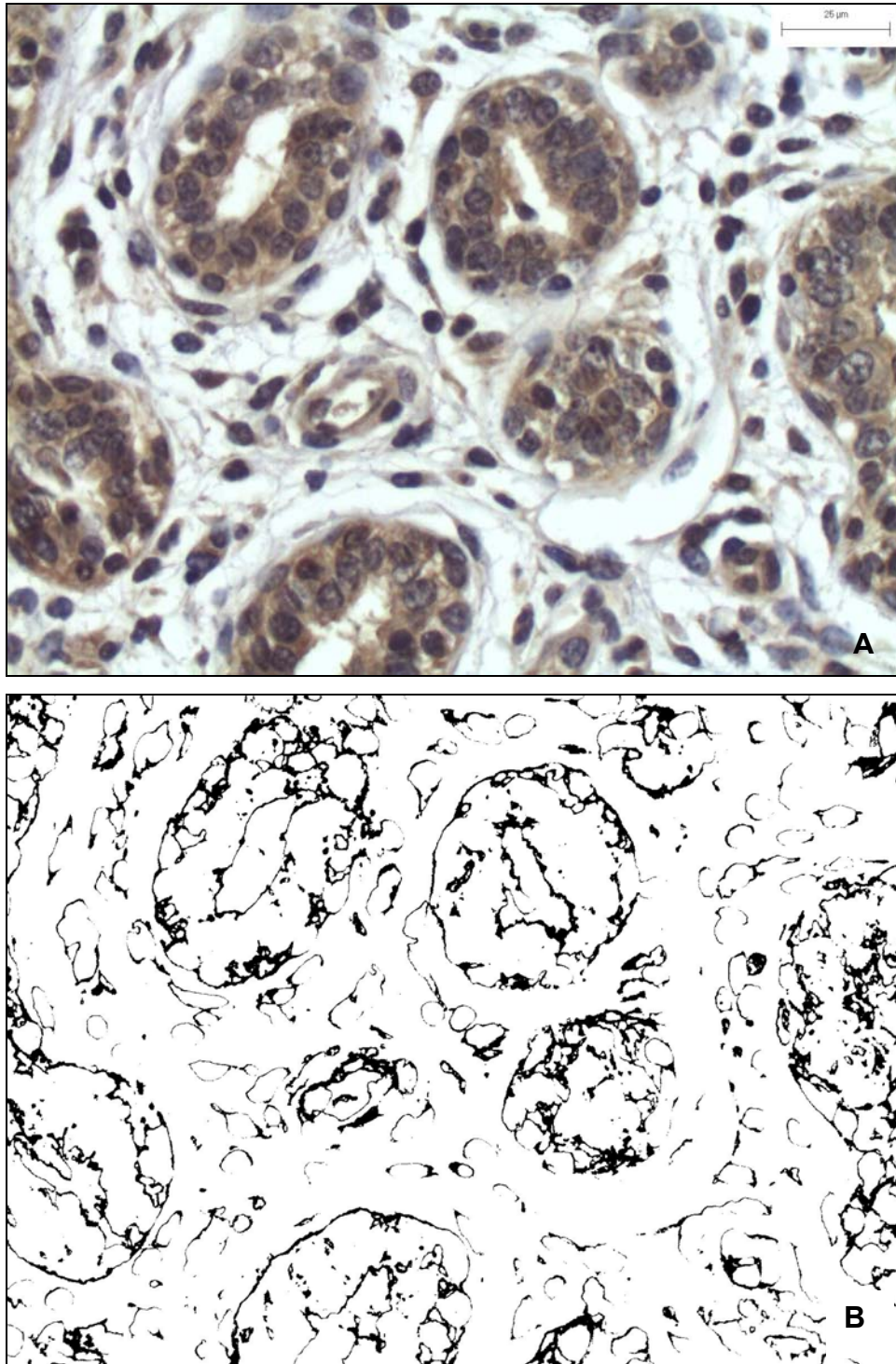


Figura 16: Inmunomarcación para IL-1 α en tejido de glándula mamaria bovina control a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

En la figura 17 se grafican los porcentajes de inmunomarcación para IL-1 α en las distintas zonas de los diferentes tratamientos estudiados.

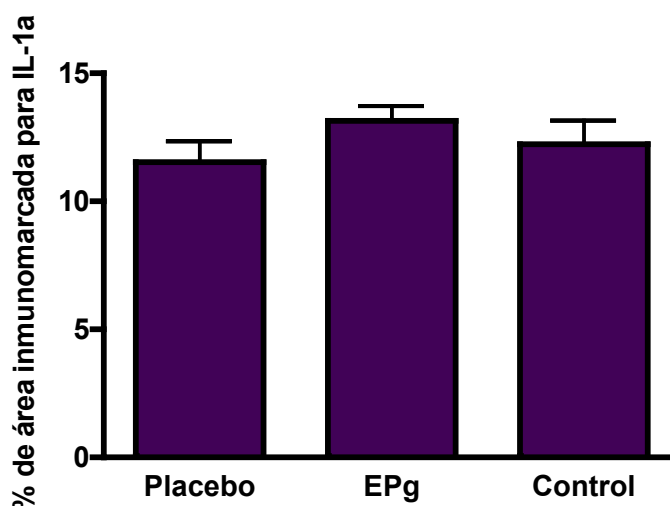


Figura 17: Porcentaje de área inmunomarcada para IL-1 α en glándula mamaria bovina para los distintos tratamientos. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM.

El análisis de los porcentajes de área inmunomarcada para las diferentes zonas evaluadas, no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$). Si bien se hallaron valores similares en los porcentajes de inmunomarcación para IL-1 α entre los tres grupos experimentales evaluados, se encontró un leve aumento no significativo ($P = 0,254$) de la expresión de esta citoquina en el grupo inoculado con el EPg comparado con los grupos placebo y controles.

4.4.2.1.3. Inmunomarcación para IL-6

La inmunomarcación de IL-6, al igual que para la IL-1 α , se detectó en todos los cuartos mamarios provenientes de los tres tratamientos evaluados. El citoplasma de las células epiteliales de los alvéolos mamarios y de los conductos de excreción se vio intensamente teñido con el cromógeno utilizado. Además, los macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos presentaron tinción positiva (figuras 18, 19 y 20).

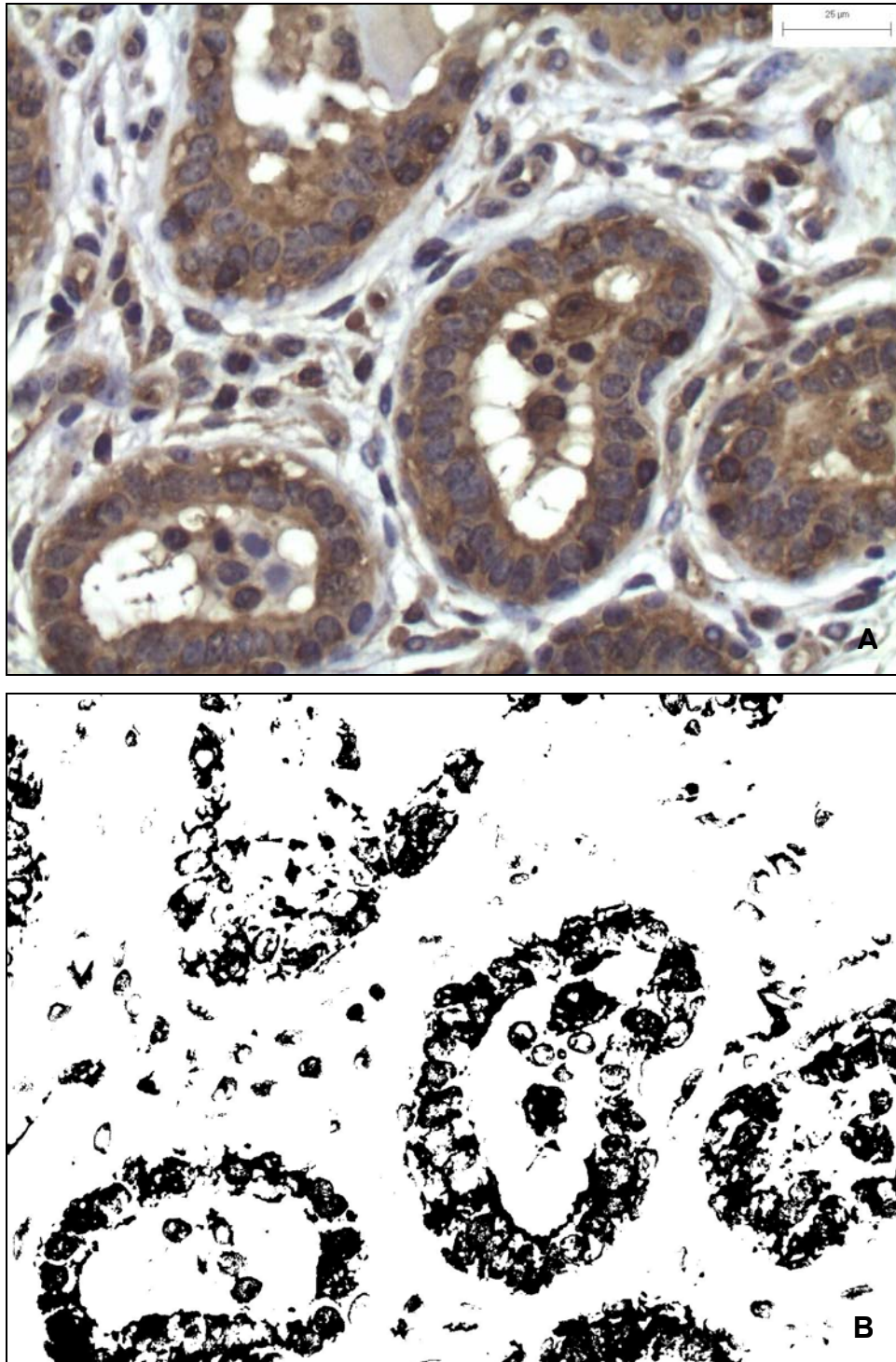


Figura 18: Inmunomarcación para IL-6 en tejido de glándula mamaria bovina inoculada con el EPg a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

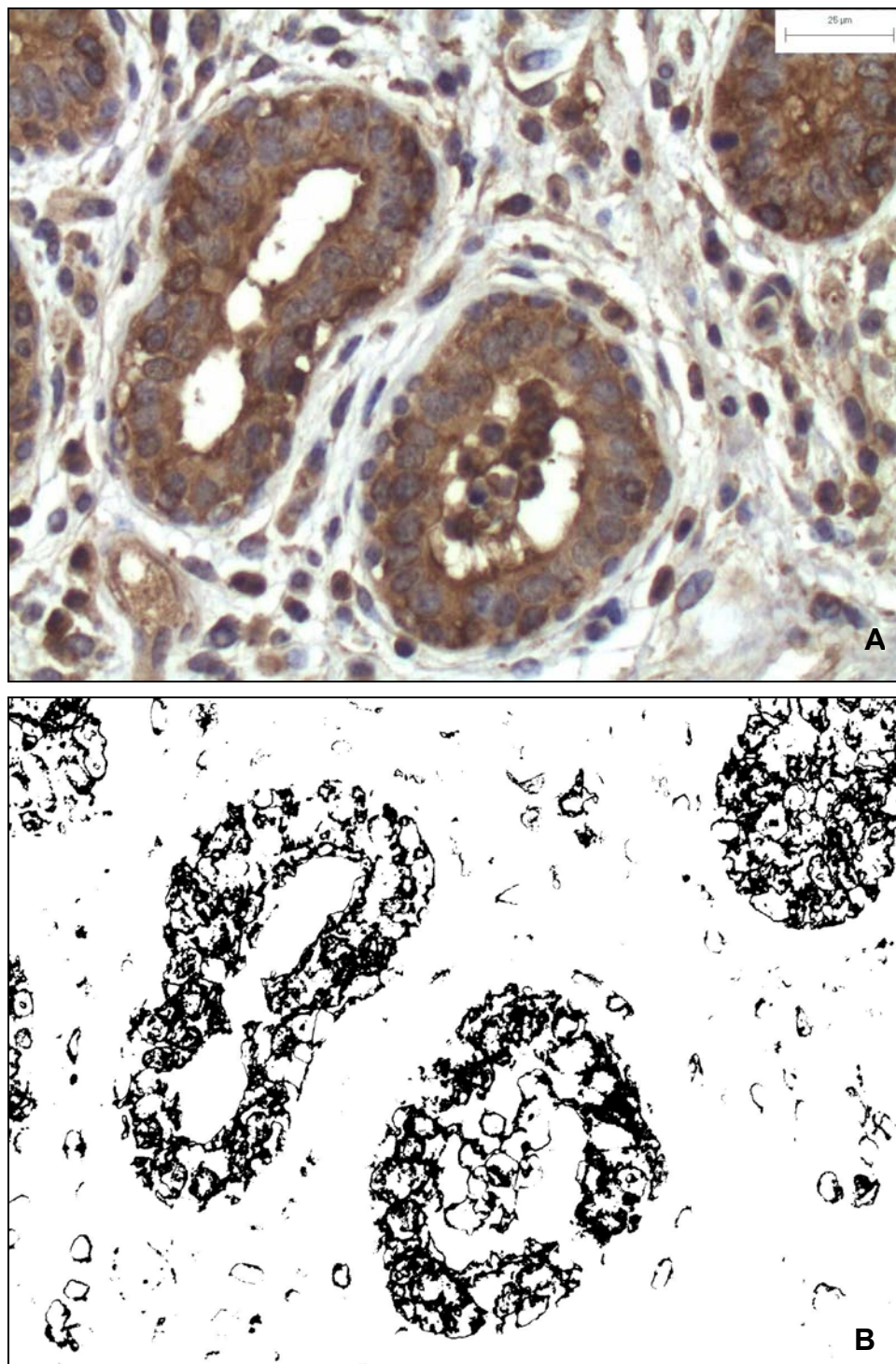


Figura 19: Inmunomarcación para IL-6 en tejido de glándula mamaria bovina inoculada con placebo a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

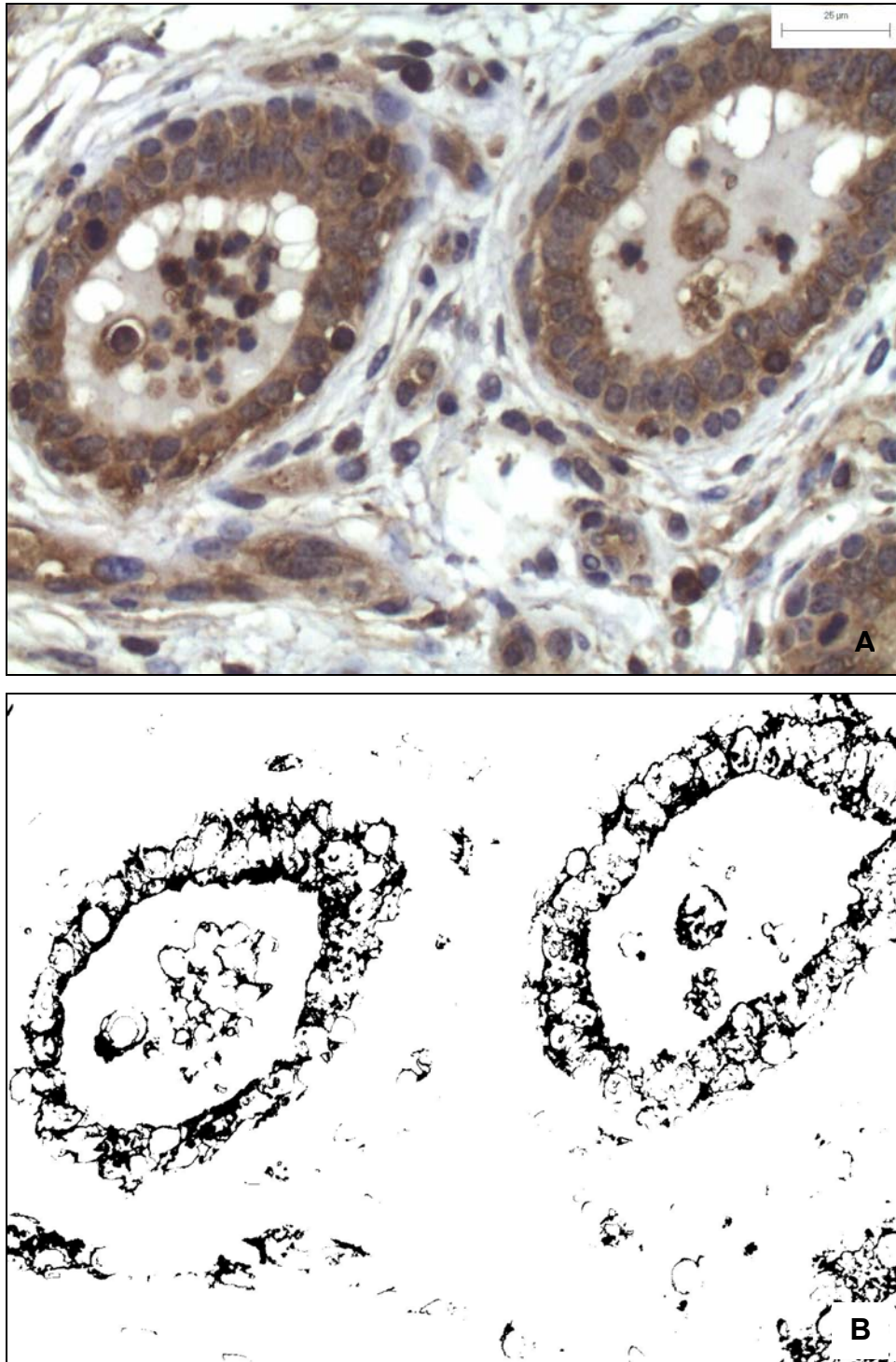


Figura 20: Inmunomarcación para IL-6 en tejido de glándula mamaria bovina control a los 7 días del secado (A). Máscara de la inmunomarcación que muestra el resultado de la segmentación de colores para la cuantificación de la IHQ (B).

La figura 21 muestra los porcentajes de área inmunomarcada para IL-6 en las distintas zonas de los diferentes tratamientos estudiados.

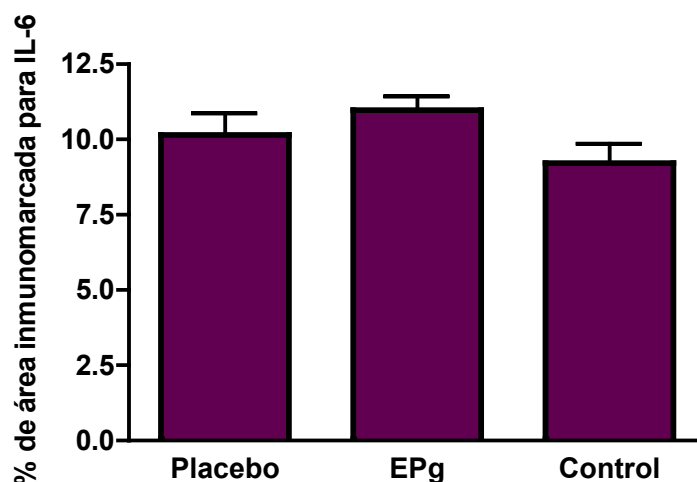


Figura 21: Porcentaje de área inmunomarcada para IL-6 en glándula mamaria bovina para los distintos tratamientos. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM.

No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de área inmunomarcada para IL-6 entre las tres zonas evaluadas ($P > 0,05$). Si bien, el porcentaje de área inmunomarcada para IL-6 obtenido en cuartos tratados con el EPg fue levemente mayor, no se encontraron diferencias significativas entre estos y los cuartos inoculados con placebo y cuartos controles ($P = 0,165$).

4.4.2.2. Cuantificación de monocitos-macrófagos mediante la expresión de CD14

Los resultados obtenidos de la cuantificación (previa identificación) de monocitos-macrófagos marcados con anti CD14 en los cuartos mamarios tratados con el EPg, placebo y controles se encuentra graficados en la figura 22.

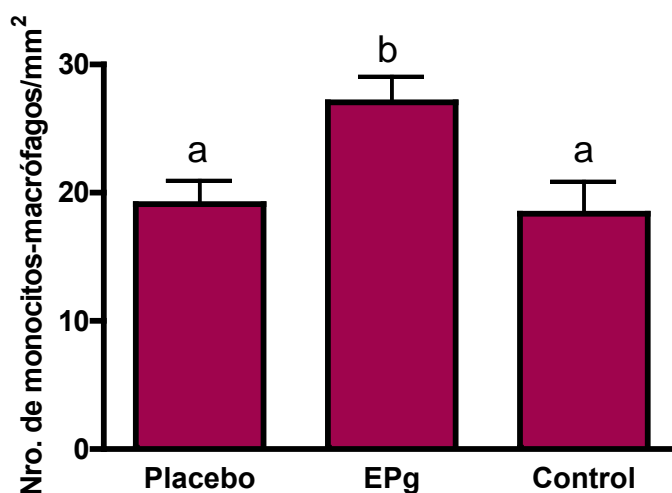
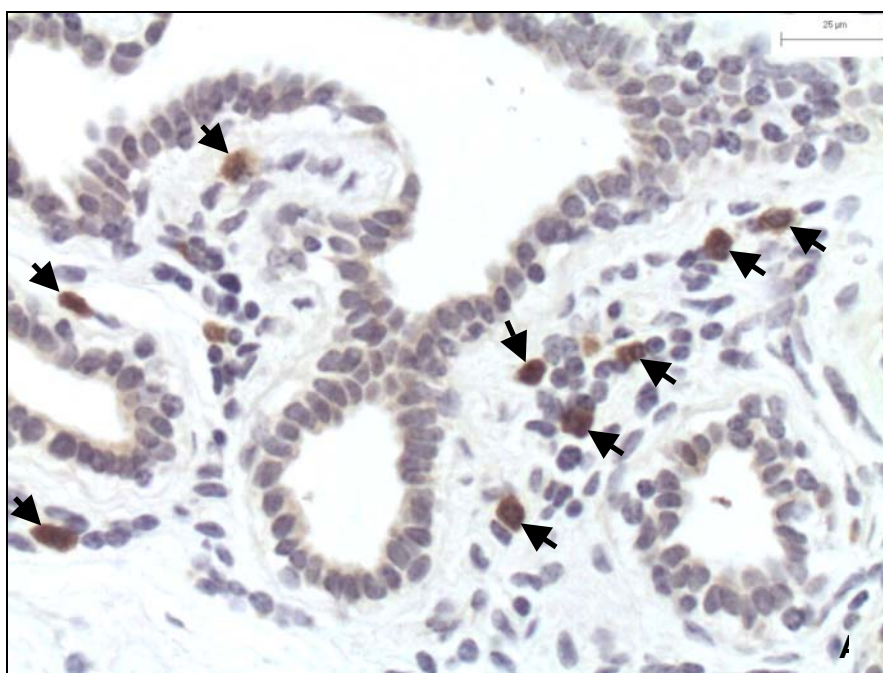


Figura 22: Número de monocitos-macrófagos por unidad de área (mm^2) marcados con CD14 en cuartos mamarios bovinos para los distintos tratamientos. Las barras representan las medias del número de monocitos-macrófagos/ mm^2 entre las distintas zonas evaluadas de cuartos tratados con EPg, placebo y control \pm SEM. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

No se encontraron diferencias significativas en la cuantificación de monocitos-macrófagos/ mm^2 entre las tres zonas evaluadas. Hubo un incremento en el número de éstas células inmunomarcadas en el grupo tratado con el EPg, respecto de los cuartos tratados con placebo y control ($P < 0,05$). El número de las células positivas fue similar en los grupos placebo y control (figura 23).



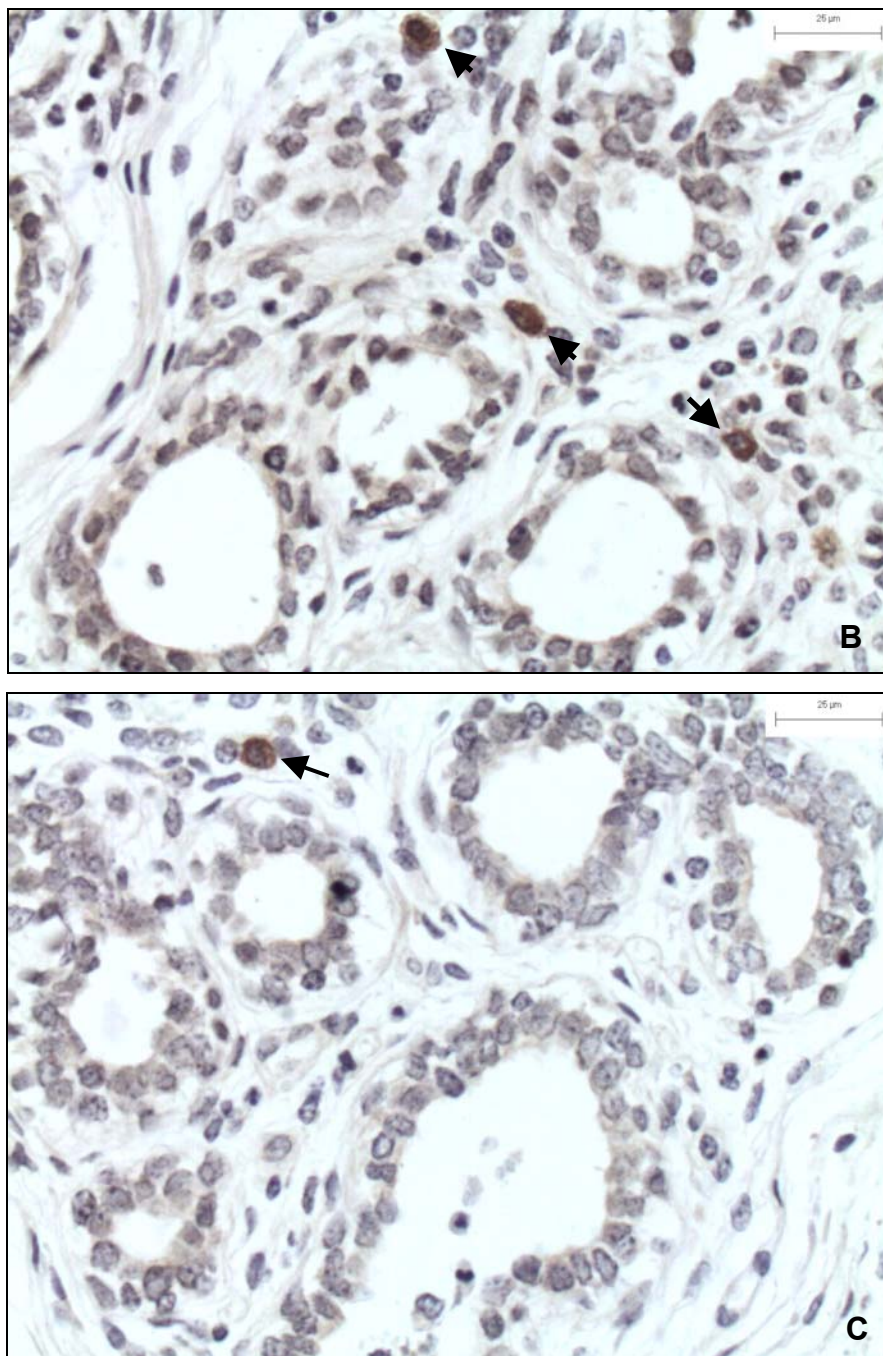


Figura 23: Inmunomarcación de monocitos-macrófagos con CD14 en tejido de glándula mamaria bovina a los 7 días del secado. Las flechas muestran monocitos-macrófagos reactivos al cromógeno utilizado. **A:** glándula mamaria inoculada con el EPg; **B:** glándula mamaria inoculada con placebo; **C:** glándula mamaria control.

4.5. Western blot a partir de muestras de leche y tejido mamario provenientes del ensayo con el EPg

4.5.1. Especificidad de los anticuerpos anti-IL-6 y anti-IL-1 α utilizados en IHQ

Mediante inmunoblot se corroboró que los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica detectaron las proteínas correspondientes de manera específica y sin reacciones cruzadas, debido a que en las membranas no se encontraron otras bandas diferentes a las bandas del peso molecular esperado. Los resultados se muestran en la figura 24.

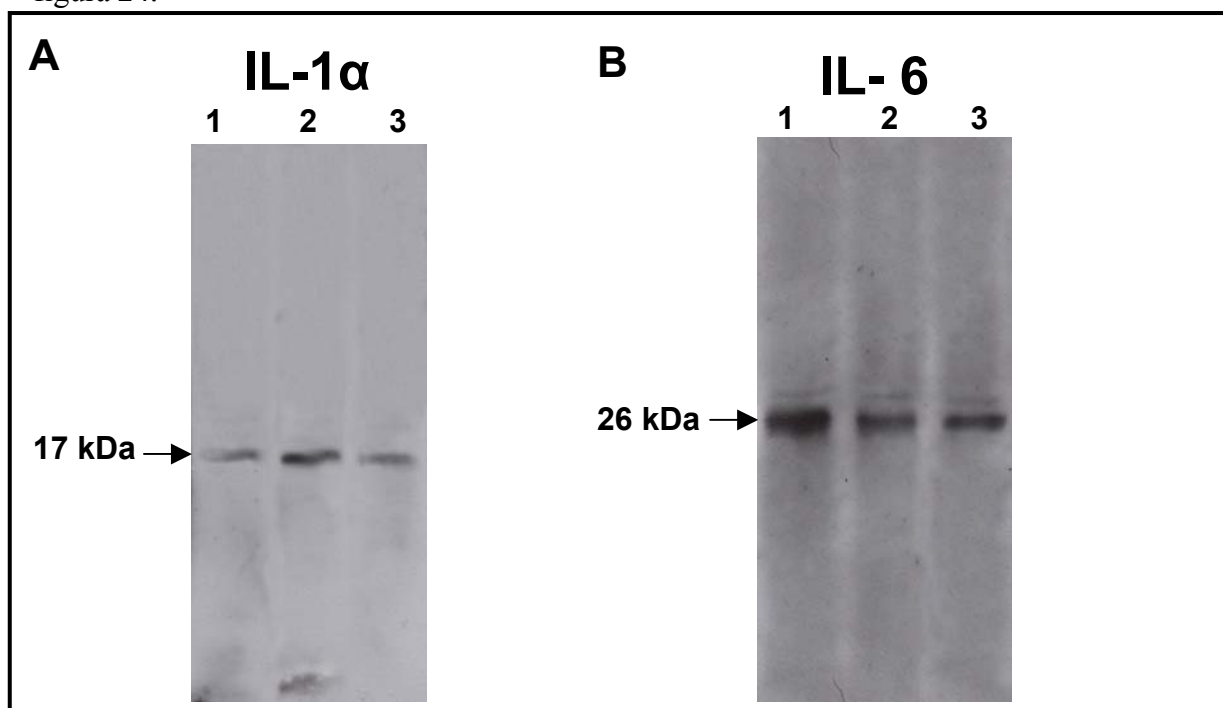


Figura 24: Inmunoblot para identificar la especificidad de anticuerpos para IHQ (anti-IL-1 α y anti-IL-6) en glándula mamaria a los 7 días PI. **A)** IL-1 α -Línea 1: glándula mamaria tratada con EPg; 2: glándula mamaria tratada con placebo; 3: glándula mamaria control. **B)** IL-6- Línea 1: glándula mamaria tratada con EPg; 2: glándula mamaria tratada con placebo; 3: glándula mamaria control.

4.5.2. Western blot para detección de TNF- α a partir de muestras de leche

Mediante western blot se determinó la expresión de la proteína TNF- α en leche proveniente del ordeño previo a la inoculación (0 hs) y a diario post-inoculación (24, 48 y 72 hs) en los cuartos inoculados con el EPg y placebo. En condiciones reductoras se encontraron bandas de 17 y 26 kDa únicamente en las muestras provenientes de cuartos

tratados con el EPg. No se encontraron bandas para las muestras tratadas con placebo. Las 2 bandas observadas son debido a que el TNF- α es sintetizado como un precursor de 26 kDa que luego es clivado finalmente en una proteína madura de secreción de 17 kDa. En la figura 25 se representan las bandas obtenidas en los distintos periodos de muestreo en muestras tratadas con el EPg.

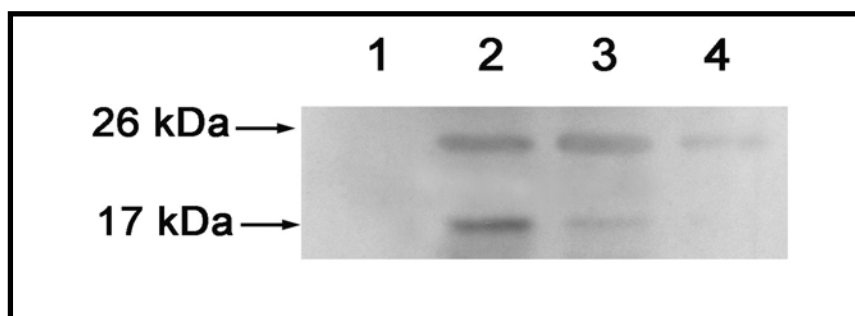


Figura 25: Detección de TNF- α en muestras de leche provenientes de cuartos inoculados con el EPg a lo largo del periodo de muestreo por western blot. Líneas 1: 0 hs pre-inoculación; 2: 24 hs PI; 3: 48 hs PI; 4: 72 hs PI. A la izquierda se indican los pesos moleculares de las bandas detectadas.

La cuantificación de TNF- α se llevó a cabo analizando solamente la DOI proveniente de las bandas de 17 kDa (proteína de secreción), ya que se consideró que en muestras de leche sólo sería representativo cuantificar la proteína final de secreción. Los resultados obtenidos para esta citoquina mostraron un aumento en los niveles de expresión de la misma a las 24 hs PI y una posterior reducción a las 48 hs PI y en comparación con todas las muestras tratadas con placebo ($P_T < 0,001$; $P_t < 0,001$) (figura 26). Además, se encontró interacción significativa para los dos factores analizados ($P_{T * t} < 0,001$) (Anexo III).

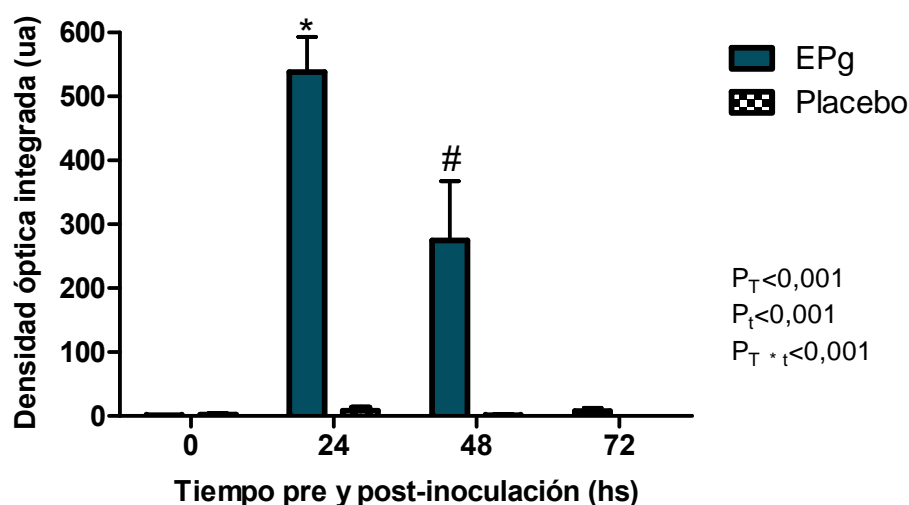


Figura 26: Análisis representativo de la cuantificación de TNF- α en muestras de leche a lo largo del periodo de muestreo. Las barras representan los valores medios de Densidad Óptica Integrada (DOI) en unidades arbitrarias (ua) \pm SEM. En los animales tratados con el EPg se observaron diferencias significativas en los períodos de 24 (*) y 48 hs (#) ($P_t < 0,001$).

4.5.3. Western blot para detección de TNF- α a partir de muestras de tejido mamario

Mediante western blot se determinó la expresión de la proteína TNF- α en muestras de tejido mamario provenientes de los cuartos inoculados con el EPg, placebo y en los cuartos controles a los 7 días del secado. En condiciones reductoras se encontraron bandas de 17 y 26 kDa en los tres grupos evaluados (figura 27).

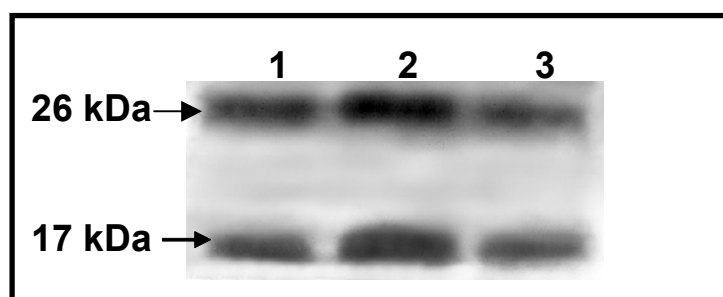


Figura 27: Detección de TNF- α en muestras de tejido mamario obtenidas a los 7 días del secado. Líneas 1: de animales control; 2: de animales inoculados con el EPg; 3: de animales inoculados con placebo. A la izquierda se indican los pesos moleculares de las bandas detectadas.

La cuantificación de TNF- α se llevó a cabo analizando la DOI proveniente de las bandas de 26 kDa (proteína de membrana) y 17 kDa (proteína madura, de secreción). Las dos bandas obtenidas se evaluaron por separado para cada grupo ensayado. Los

resultados obtenidos entre los tres grupos arrojaron diferencias significativas en la banda de 26 kDa en cuartos tratados con el EPg ($P < 0,05$). Para la misma banda, no se hallaron diferencias entre los grupos inoculados con placebo y control. ($P > 0,05$). Para el análisis de la banda de 17 kDa, si bien, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos evaluados ($P = 0,163$), hubo un aumento en la expresión de TNF- α en tejido mamario de muestras tratadas con EPg (figura 28).

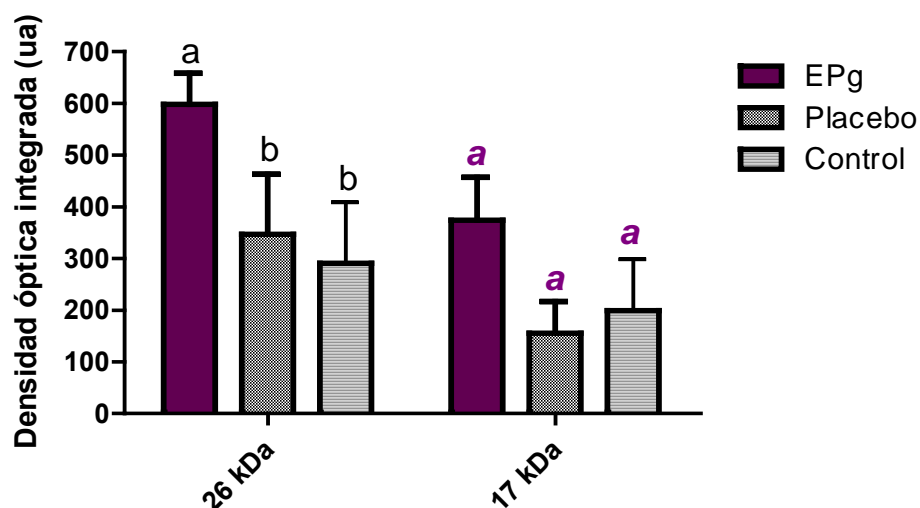


Figura 28: Análisis representativo de la cuantificación de TNF- α en tejido mamario en los distintos grupos estudiados. Las barras representan los valores medios de DOI en unidades arbitrarias (ua) \pm SEM. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

4.6. Transcripción reversa (RT) y análisis de la expresión de citoquinas mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

4.6.1. Detección de transcritos de ARN mensajero de citoquinas en leche provenientes del ensayo con el EPg

Los transcritos de ARNm para las citoquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-8 y TNF- α fueron detectados en todos los grupos experimentales. En contraste, los transcritos de ARNm para los genes de IL-2, IL-4, IL-6 e INF- γ no se encontraron en ninguna de las muestras de leche. Por lo tanto, se realizaron RT-PCR en muestras de ganglio linfático bovino para determinar la capacidad de hibridación de los cebadores (controles positivos), obteniéndose bandas en el peso molecular que corresponde al peso del transcrito de los ARNm buscados: IL-2 (248 pb), IL-4 (200 pb), IL-6 (187 pb), INF- γ (215 pb) (figura 29).

El resultado de la secuenciación para los productos amplificados de IL-2 denota que la secuencia correspondiente a la banda de 248 pb tuvo un 99 % de similitud con la secuencia de la IL-2 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso EU276068.1). Para IL-4, la secuencia correspondiente a la banda de 200 pb tuvo un 96 % de similitud con la secuencia de la IL-4 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso EU276069.1). Para la banda correspondiente a 187 pb (IL-6), los resultados de la secuenciación arrojaron un 99 % de similitud con la secuencia de la IL-6 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso EU276071.1). Por último, la secuencia correspondiente a la banda de 215 pb tuvo un 98 % de similitud con la secuencia de la INF- γ de *Bos taurus* presente en (GenBank Nro. Acceso FJ263670.1). Los resultados obtenidos mediante BLASTn se muestran en el Anexo II.

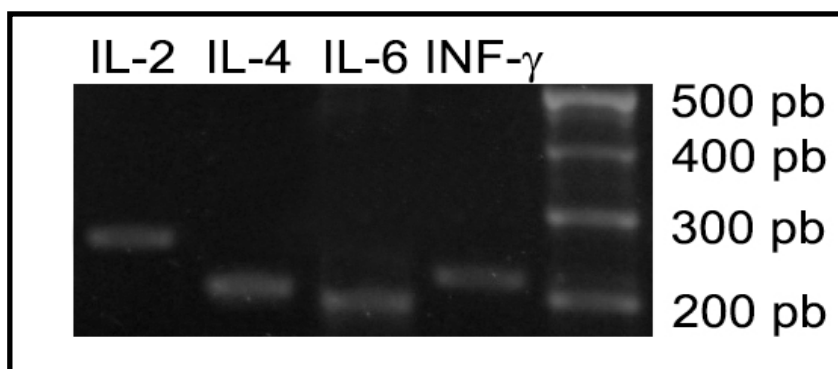


Figura 29: Gel de agarosa (2%). Productos de RT-PCR de citoquinas provenientes de muestras de ganglio linfático bovino. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y arriba se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas.

4.6.2. Análisis de la cinética para la estandarización de cada par de cebadores para las distintas citoquinas detectadas en leche

Los resultados del análisis de la cinética, con el objetivo de determinar el número de ciclos óptimos para cada reacción de PCR de citoquinas presentes en leche, se muestran en la figura 30.

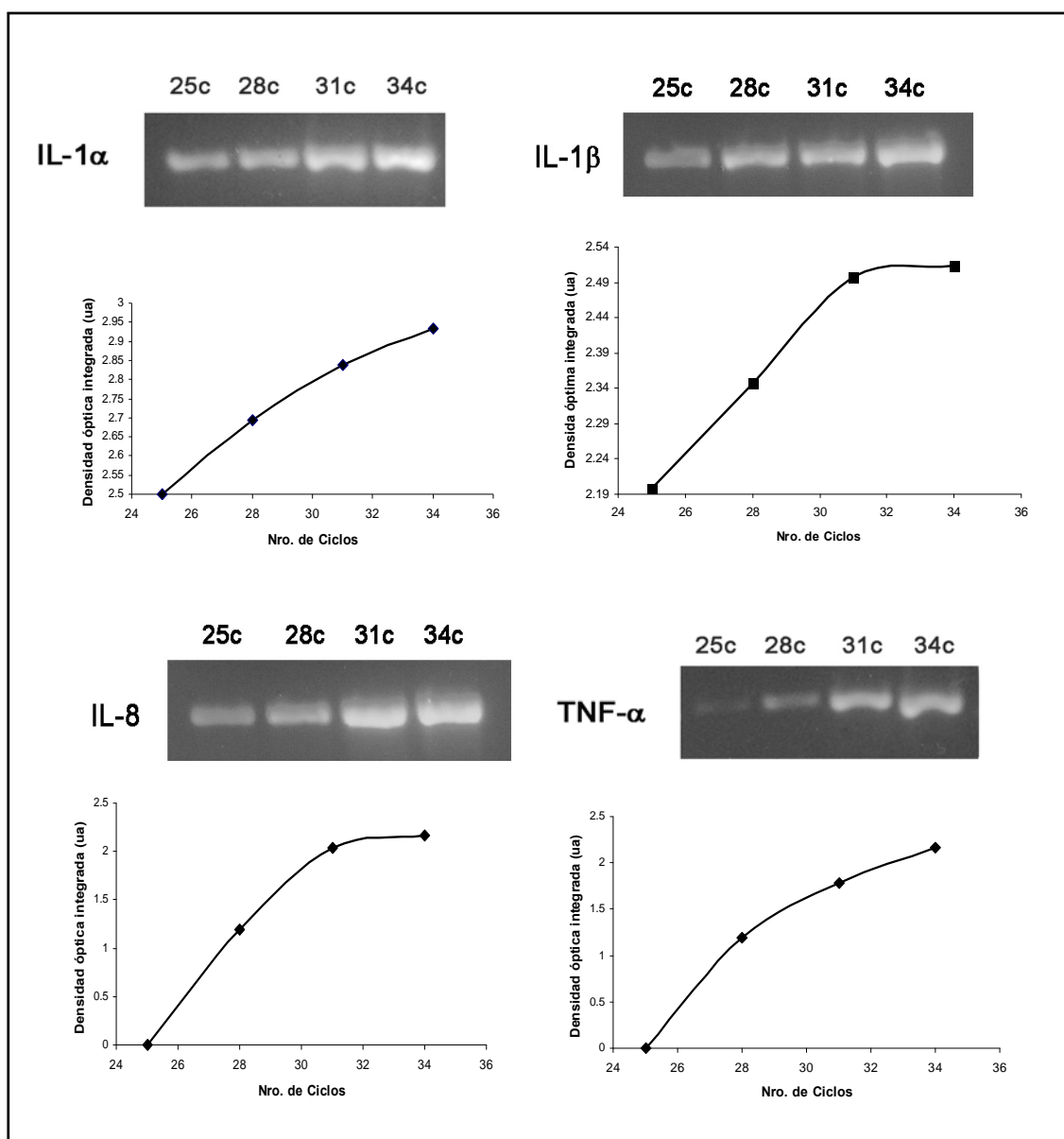


Figura 30: Optimización del número de ciclos utilizados en los ensayos de PCR para las distintas citoquinas a partir de muestras de leche. Cinética para IL-1 α , IL-1 β , IL-8 y TNF- α .

El número de ciclos óptimo para cada par de cebadores para la caracterización de las distintas citoquinas encontradas en leche, fue elegido estableciendo la zona de síntesis exponencial de los amplificadores y de linealidad respecto a la carga de ARN inicial. Para la amplificación de las citoquinas IL-1 α y TNF- α se utilizaron 33 ciclos y para IL-1 β e IL-8 se utilizaron 30 ciclos.

4.6.3. Caracterización de la síntesis de citoquinas por PCR

Los amplificadores para β -actina (gen normalizador de la PCR, 290 pb) fueron localizados en todas las muestras de leche estudiadas y con un patrón de expresión

constante en los dos grupos estudiados, por lo tanto la elección de este gen como normalizador se consideró adecuada (figura 31). La secuencia correspondiente a la banda de 290 pb tuvo un 100 % de similitud con la secuencia de la β -actina de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso BC142413.1) (Anexo II).

Para evaluar la expresión de citoquinas en células somáticas extraídas de muestras de leche provenientes de animales inoculados con EPg y placebo durante la involución temprana de la glándula mamaria, a lo largo de todo el periodo de muestreo (0, 24, 48 y 72 hs), se realizó una semicuantificación de la DOI para cada banda obtenida con cada cebador para citoquinas.

Los resultados fueron expresados como la relación entre la DOI de la señal de los productos de PCR para cada citoquina detectada y la DOI de la señal de la expresión constitutiva de β -actina.

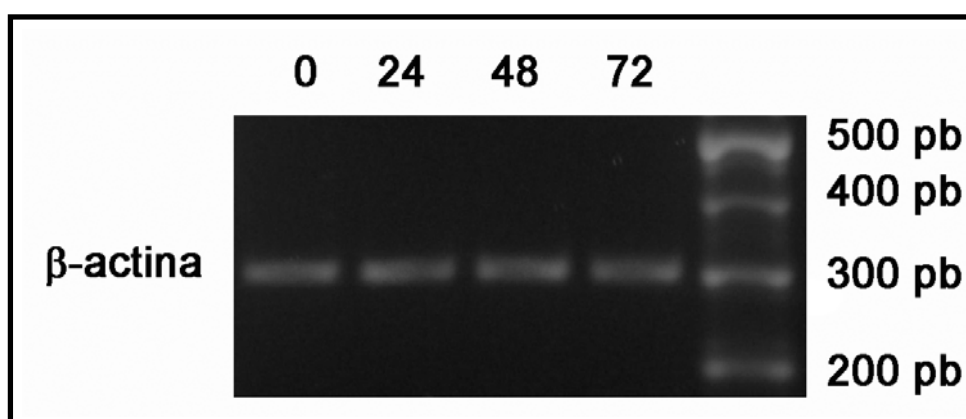


Figura 31: Gel de agarosa (2%). Productos de amplificados de RT-PCR de β -actina provenientes de muestras tratadas con el EPg a distintas horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas.

4.6.3.1. Niveles de expresión de *IL-1 α* :

La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) de los ADNc obtenidos a partir de muestras de leche tomadas a las 0 hs antes de la inoculación y a las 24, 48 y 72 hs PI, usando los cebadores que se describen en la tabla 5, generaron amplificaciones de 291 pb, correspondiente con la longitud esperada del fragmento amplificado de la *IL-1 α* (figura 32). La secuencia correspondiente a la banda de 291, tuvo un 100 % de similitud

con la secuencia de la IL-1 α de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso NM_174092.1) (Anexo II).

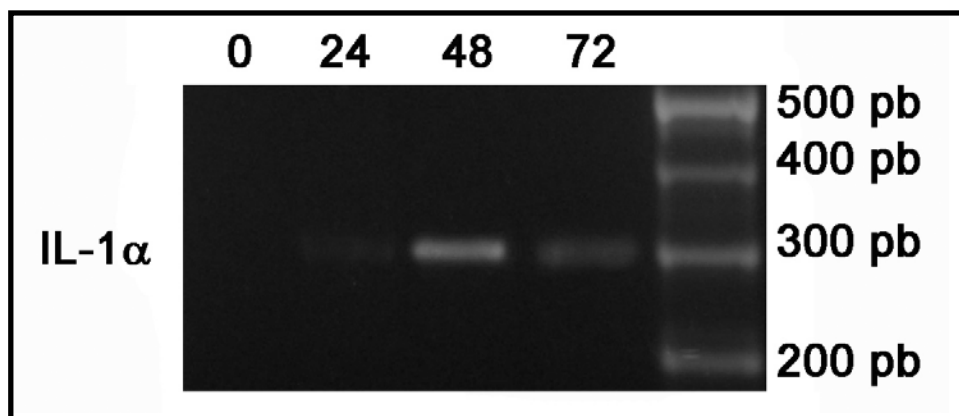


Figura 32: Gel de agarosa (2%). Productos de amplificados de RT-PCR de IL-1 α provenientes de muestras tratadas con el EPg a distintas horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas.

La expresión de ARNm de la IL-1 α se vio incrementada significativamente en las muestras de leche provenientes de cuartos tratadas con el EPg a la 48 hs PI ($P_T=0,049$; $P_t=0,001$) (figura 33). Además, se encontró interacción significativa para los dos factores analizados ($P_{T*t}=0,049$) (Anexo III).

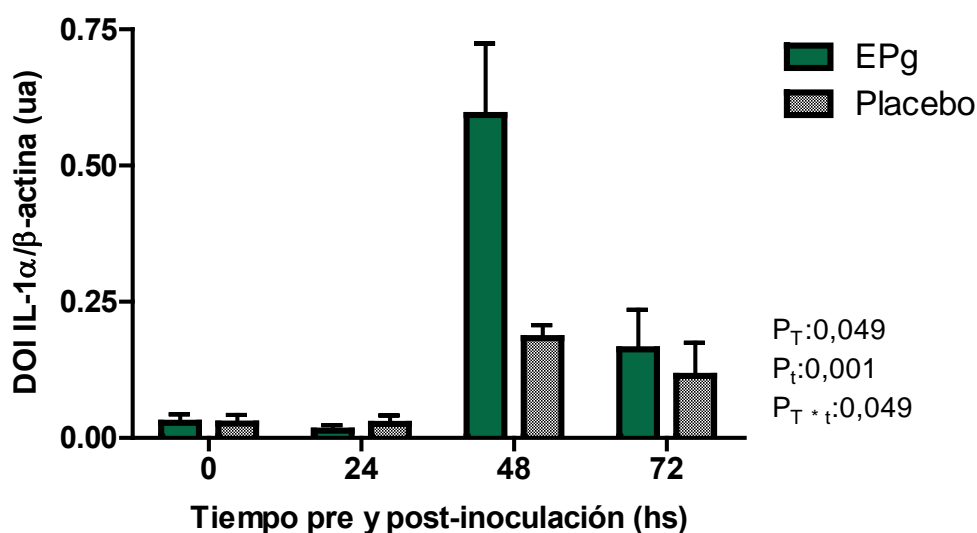


Figura 33: Semicuantificación del ARNm de IL-1 α en células somáticas de leche proveniente de cuartos mamarios tratados con el EPg y placebo a distintas horas de muestreo. Las barras representan los valores medios de DOI para IL-1 α en relación a β -actina (ua) \pm SEM.

4.6.3.2. Niveles de expresión de IL-1 β :

La reacción de PCR de los ADNc obtenidos a partir de muestras de leche inoculados con EPg y placebo generaron amplificaciones de 231 pb, correspondiente con la longitud esperada del fragmento amplificado de la IL-1 β (figura 34). La secuencia correspondiente a la banda de 231, tuvo un 100 % de similitud con la secuencia de la IL-1 β de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso EU276067.1) (Anexo II).

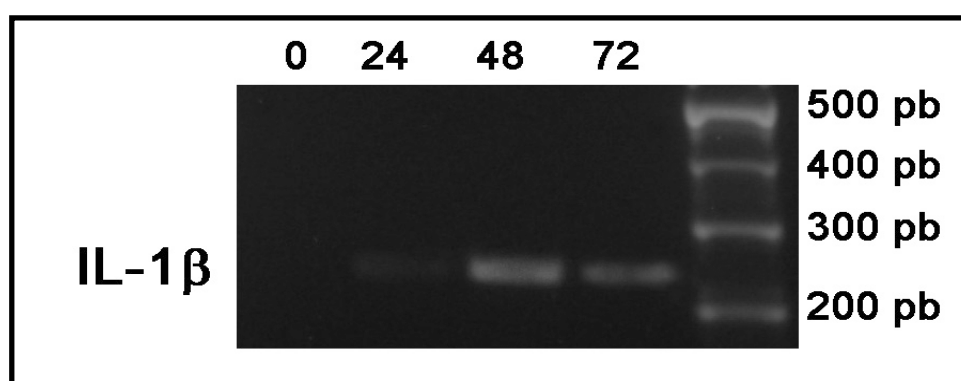


Figura 34: Gel de agarosa (2%). Productos de amplificados de RT-PCR de IL-1 β provenientes de muestras tratadas con el EPg a distintas horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas.

Los resultados expresados como la relación DOI de IL-1 β y β -actina mostraron un aumento significativo en los niveles de ARNm de las muestras de cuartos inoculados con EPg a las 48 hs PI ($P_T=0,040$; $P_t=0,038$), en relación a los inoculados con placebo. Si bien, a las 72 hs PI no se encontraron diferencias en los niveles de ARNm en esta citoquina entre los dos grupos analizados, se evidenció una tendencia en aumento en su expresión a este tiempo de muestreo en las secreciones de leche de cuartos tratados con el EPg (figura 35). Además, se encontró interacción significativa para los dos factores analizados ($P_{T*t}=0,015$) (Anexo III).

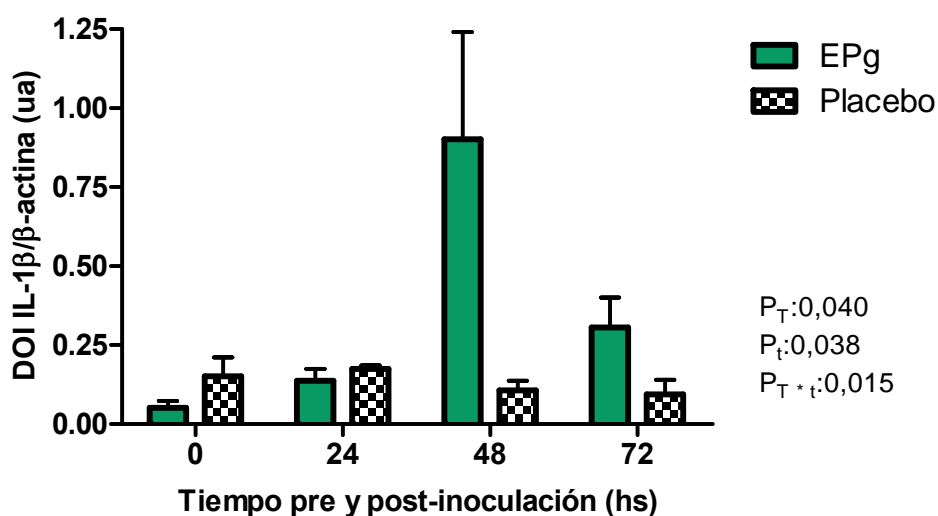


Figura 35: Semicuantificación del ARNm de IL-1 β en células somáticas de leche proveniente de cuartos mamarios tratados con el EPg y placebo a distintas horas de muestreo. Las barras representan los valores medios de DOI para IL-1 β en relación a β -actina (ua) \pm SEM.

4.6.3.3. Niveles de expresión de IL-8:

Como productos de las PCRs realizadas para determinar la expresión de IL-8 en muestras de leche se obtuvieron bandas de 260 pb, correspondiente con la longitud esperada del fragmento amplificado de la IL-8 (figura 36). La secuencia correspondiente a la banda de 260, tuvo un 100 % de similitud con la secuencia de la IL-8 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso EU276073.1) (Anexo II).

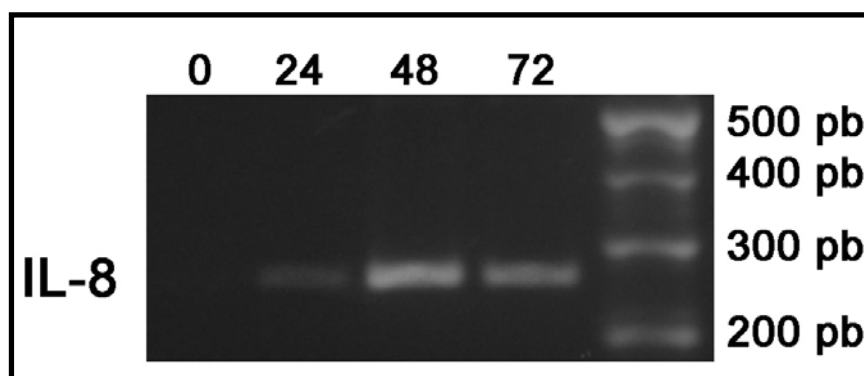


Figura 36: Gel de agarosa (2%). Productos de amplificados de RT-PCR de IL-8 provenientes de muestras tratadas con el EPg a diferentes horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas.

Si bien, los niveles de ARNm obtenidos para IL-8 que arrojó la semicuantificación, no mostraron diferencias significativas en ninguno de los periodos de muestreo entre las muestras de leche de cuartos mamarios de animales inoculados con el EPg y con placebo, hubo una tendencia al aumento en cuartos tratados con EPg a las 24 y 48 hs PI en relación a cuartos tratados con placebo ($P_T=0,675$; $P_t=0,349$) (figura 37).

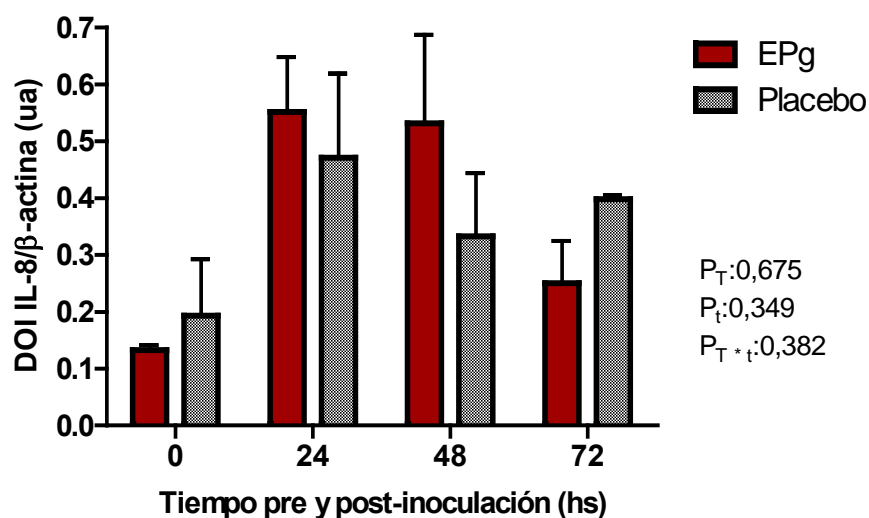


Figura 37: Semicuantificación del ARNm de IL-8 en células somáticas de leche proveniente de cuartos mamarios tratados con el EPg y placebo a distintas horas de muestreo. Las barras representan los valores medios de DOI para IL-8 en relación a β -actina (ua) \pm SEM.

4.6.3.4. Niveles de expresión de TNF- α :

Como productos de las PCRs realizadas para determinar la expresión de TNF- α en muestras de leche se obtuvieron bandas de 315 pb, correspondiente con la longitud esperada del fragmento amplificado de TNF- α (figura 38). La secuencia correspondiente a la banda de 315, tuvo un 100 % de similitud con la secuencia de la TNF- α de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso EU276079.1) (Anexo II).

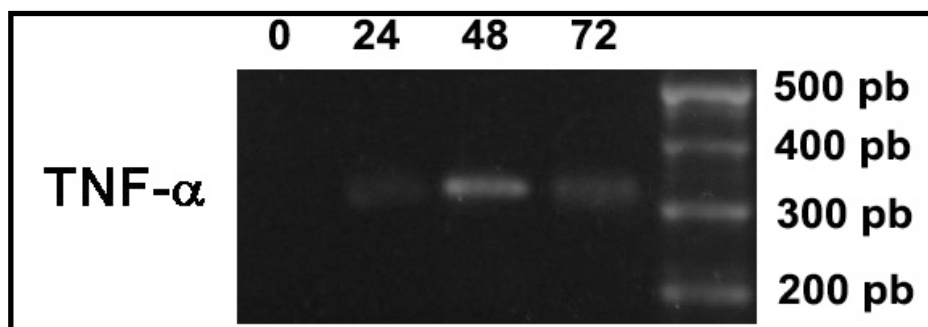


Figura 38: Gel de agarosa (2%). Productos de amplificados de RT-PCR de TNF- α provenientes de muestras tratadas con el EPg a diferentes horas de muestreo. A la derecha se denotan los pesos moleculares correspondientes al patrón de pares de bases y a la izquierda se muestra la identificación del gen que corresponde a las bandas obtenidas.

Los resultados de la semicuantificación obtenidos determinan que la expresión del ARNm de TNF- α se vio incrementada significativamente a la 48 hs PI en las muestras de leche provenientes de cuartos mamarios tratadas con el EPg ($P_t=0,009$) figura 39. Además, se encontró interacción significativa para los dos factores analizados ($P_{T * t}=0,006$) (Anexo III).

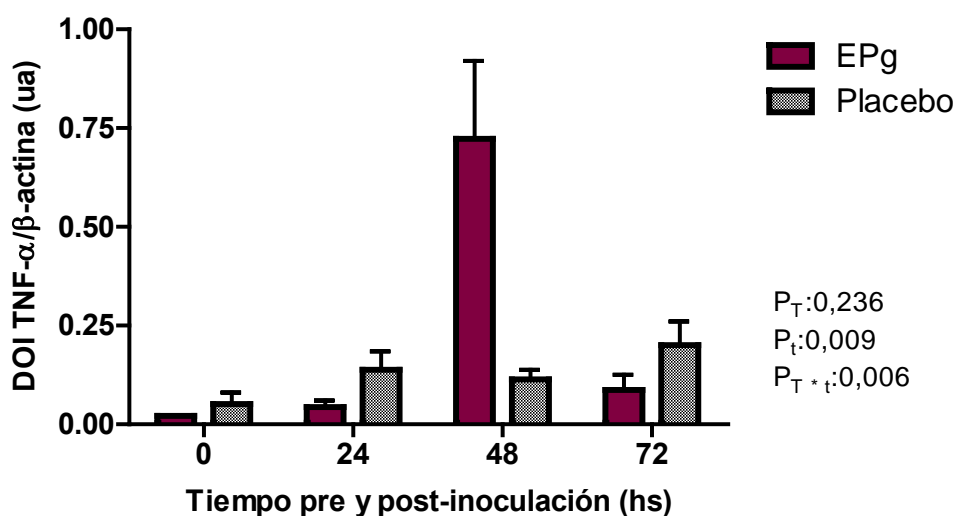


Figura 39: Semicuantificación del ARNm de TNF- α en células somáticas de leche proveniente de cuartos mamarios tratados con el EPg y placebo a distintas horas de muestreo. Las barras representan los valores medios de DOI para TNF- α en relación a β -actina (ua) \pm SEM.

4.7. Método directo de conteo de células somáticas de leche como alternativa a la citometría de flujo

4.7.1. Cuantificación de células somáticas por IHQ en extendidos de leche - Método directo

Los resultados obtenidos de la cuantificación (previa identificación) de las tres categorías celulares presentes en los extendidos de leche: células epiteliales (AE1-AE3+), leucocitos polimorfonucleares (LPMN) (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y leucocitos monocucleares (linfocitos y monocitos), se representan en la tabla 7.

Tabla 7: Porcentajes de células inmunomarcadas y coloreadas con coloración de contraste en extendidos de leche. Valores absolutos/ml hallados en relación al RCS. (A) Valores obtenidos de células epiteliales inmunomarcadas. (B) Valores obtenidos de LPMN. (C) Valores obtenidos de leucocitos mononucleares.

A	RCS (células/ml)	% AE1-AE3 (+)	Células Epiteliales/ml
	5000	38.30	1915
	51000	29.10	14841
	62000	12.57	7796
	96000	4.19	4020
	3710000	0.93	34417
	4835000	0.48	22968

B	RCS (células/ml)	% LPMN	LPMN/ml
	5000	48.94	2447
	51000	60.85	31032
	62000	73.95	45850
	96000	78.81	75655
	3710000	95.77	3553088
	4835000	96.76	4678544

C	RCS (células/ml)	% Leucocitos	Leucocitos
		mononucleares	mononucleares/ml
	5000	12.77	638
	51000	10.05	5127
	62000	13.47	8353
	96000	17.01	16325
	3710000	3.30	122495
	4835000	2.76	133487

El citoplasma de las células epiteliales reaccionó intensamente con el anticuerpo utilizado, mientras que lo demás tipos celulares se tiñeron con la coloración de contraste realizada. Claramente se observa que al aumentar el RCS aumenta proporcionalmente el porcentaje de LPMN, mientras que los porcentajes de células AE1-AE3+ y leucocitos mononucleares disminuyen a medida que el RCS aumenta. En la figura 40, se representan imágenes tomadas de la IHQ en extendidos en tres diferentes RCS evaluados.

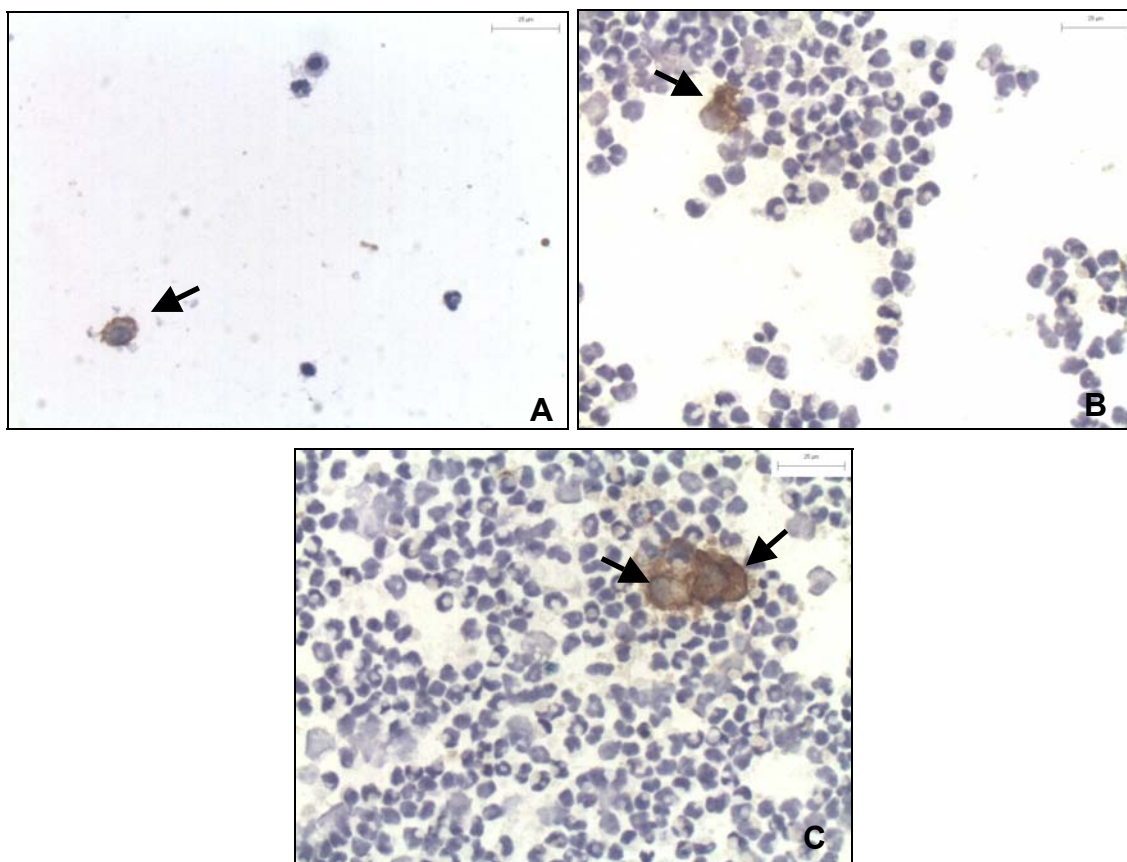


Figura 40: Inmunomarcación para AE1-AE3 en extendidos de leche con diferentes RCS. Células epiteliales con reacción positiva al anticuerpo utilizado (flechas). (A) RCS: 5000 células/ml; (B) RCS: 62000 células/ml; (C) RCS: 3710000 células/ml.

4.7.2. Cuantificación de células por Citometría de Flujo

4.7.2.1. Cuantificación de monocitos-macrófagos mediante la determinación del antígeno de superficie CD14

En la figura 41 se representan los gráficos de densidad para las distintas muestras de leche con diferente RCS. Se definió a la región R2 como la región positiva para CD14. Además, se muestran los histogramas representativos del porcentaje de células CD14+ en función al número de eventos evaluados (región M1).

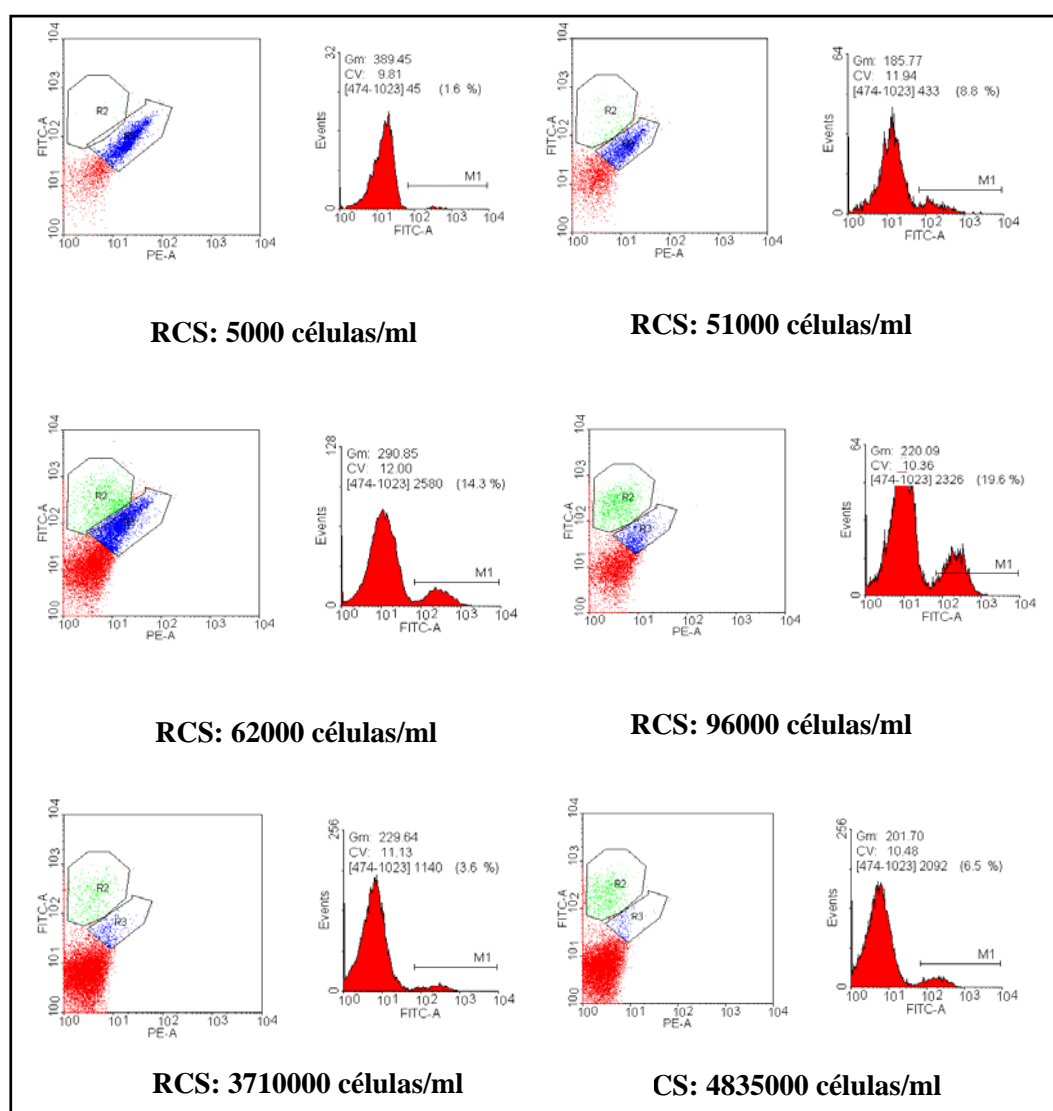


Figura 41: Gráficos de densidad (izquierda) e histogramas (derecha) que muestran el porcentaje de células positivas para CD14 (región R2 en gráficos de densidad y M1 en histogramas), para cada muestra ensayada.

La tabla 8 resume los porcentajes de células positivas para CD14 y los valores absolutos de células CD14+/ml evaluadas por CF. Se observó que al aumentar el número de células provenientes del RCS también aumentó el porcentaje de células CD14+ (monocitos-macrófagos) identificados por CF. Cuando el RCS alcanzó valores mayores a 1.000.000 de células/ml el porcentaje de células CD14+ disminuyó.

Tabla 8: Porcentajes de células positivas (monocitos-macrófagos) y valores absolutos/ml hallados en relación al RCS por CF en muestras de leche para el antígeno de superficie (CD14+).

RCS (células/ml)	% CD14 (+)	Células CD14 (+) /ml
5000	1,6	80
51000	8,8	4488
62000	14,3	8866
96000	19,6	18528
3710000	3,6	133560
4835000	6,5	314275

4.7.2.2. Cuantificación de células epiteliales mediante la determinación de antígenos intracelulares (citoqueratinas)

En la figura 42 se representa los gráficos de densidad para las distintas muestras con diferentes RCS. Se definió a la región R2 como la región positiva para AE1-AE3. Además, se muestran los histogramas representativos del porcentaje de células AE1-AE3+ en función al número de eventos evaluados (región M1).

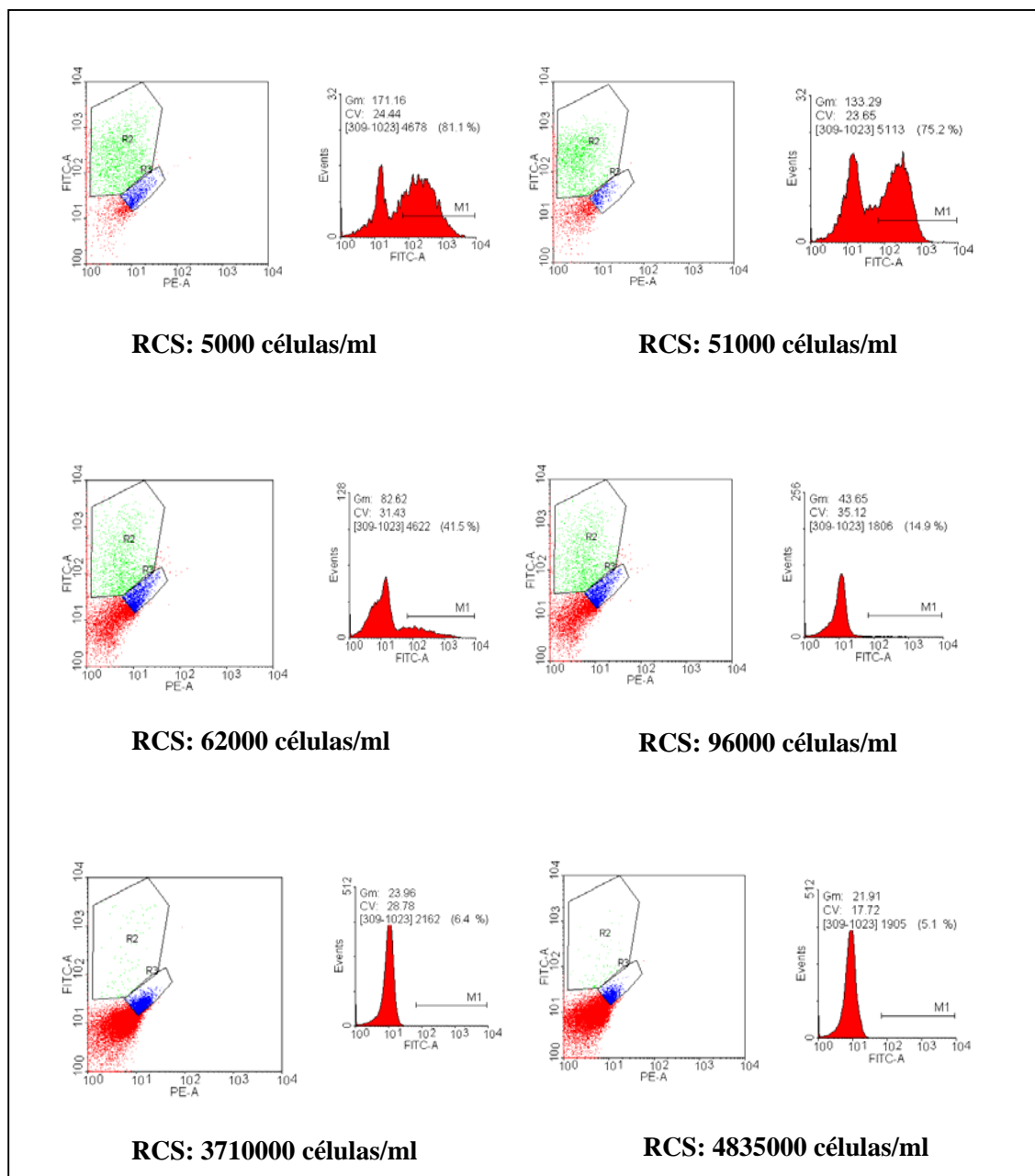


Figura 42: Gráficos de densidad (izquierda) e histogramas (derecha) que muestran el porcentaje de células positivas para AE1-AE3 (región R2 en gráficos de densidad y M1 en histogramas), para cada muestra ensayada.

La tabla 9 resume los porcentajes de células positivas para AE1-AE3 y los valores absolutos de células AE1-AE3+/ml evaluadas por CF. Se observa que el % de células epiteliales marcadas por CF es inversamente proporcional al RCS.

Tabla 9: Porcentajes de células positivas y valores absolutos/ml hallados en relación al RCS por CF en muestras de leche para el antígeno intracelular estudiado (AE1-AE3+).

RCS (células/ml)	% AE1-AE3 (+)	Células AE1-AE3 (+) /ml
5000	81,1	4055
51000	75,2	38352
62000	41,5	25730
96000	14,9	14304
3710000	6,4	237440
4835000	5,1	246585

4.7.3. Resultados de correlaciones entre las poblaciones celulares halladas por IHQ en extendidos y CF

4.7.3.1. *Células AE1-AE3+ (IHQ) vs. Células AE1-AE3+ (CF)*

La correlación realizada, con el objetivo de determinar si las dos variables analizadas (conteo de células AE1-AE3+ mediante IHQ y CF) están relacionadas ó si existe una relación lineal entre ellas, fue significativa ($P < 0,01$). Se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson cercano a 1 ($r = 0,985$) definiendo que para este tipo celular estudiado existe una relación lineal positiva entre los dos métodos evaluados (figura 43).

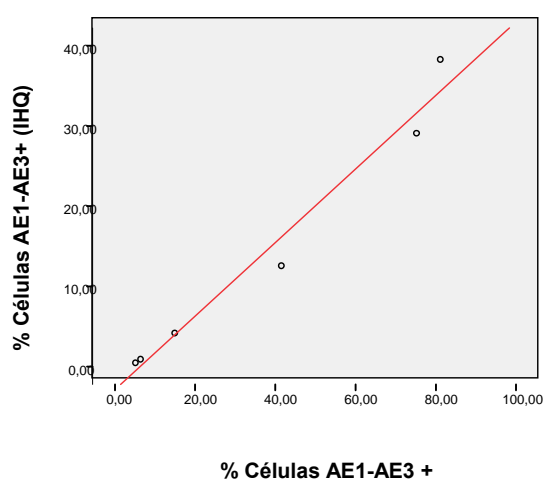


Figura 43: Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de células AE1-AE3+ (IHQ) vs. el porcentaje de células AE1-AE3+ (CF) ($r = 0,985$; $P < 0,01$).

4.7.3.2. LPMN (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

La correlación evaluada entre el conteo celular directo de LPMN por IHQ y células CD14+ por CF no fue significativa ($P=0,852$), obteniéndose un coeficiente de correlación cercano a 0 ($r=0,099$). No existe relación lineal entre ambas técnicas empleadas para estos tipos celulares analizados (figura 44).

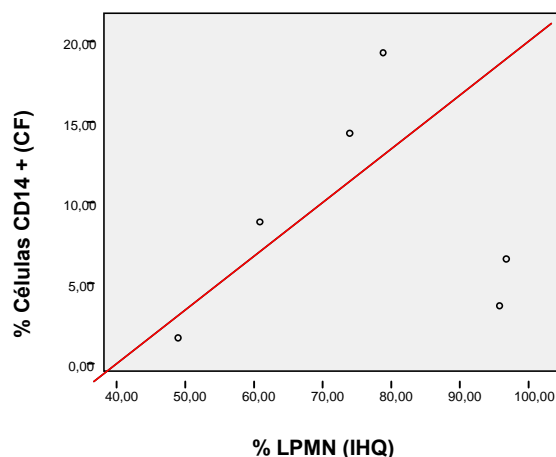


Figura 44: Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de LPMN (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,099$; $P=0,852$).

4.7.3.3. LPMN y leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

La correlación evaluada entre el conteo celular por el método directo de LPMN y leucocitos mononucleares por IHQ y células CD14+ por CF no fue significativa ($P=0,496$) con un coeficiente de correlación cercano al 0 ($r=0,351$). No existe relación lineal entre ambas técnicas empleadas para estos tipos celulares analizados (figura 45).

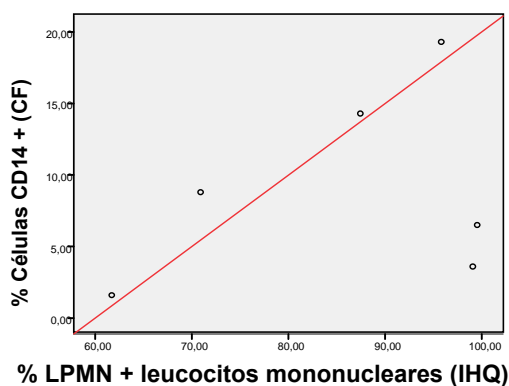


Figura 45: Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de LPMN y leucocitos mononucleares (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,351$; $P=0,496$).

4.7.3.4 Leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

La correlación realizada entre el conteo por el método directo de leucocitos mononucleares por IHQ y células CD14+ por CF no fue significativa ($P=0,167$), obteniéndose el siguiente coeficiente de correlación $r=0,644$. La correlación hallada para estos tipos celulares cuyo recuento se realizó mediante ambas técnicas no representa una relación lineal (figura 46).

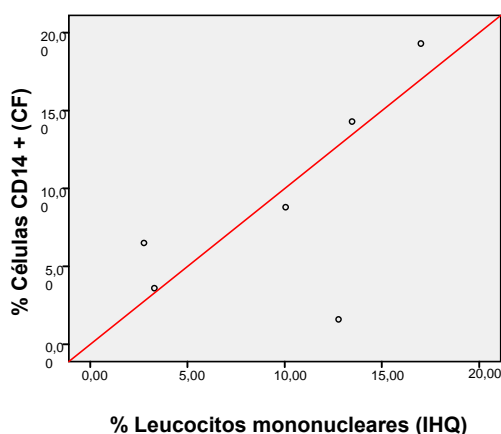


Figura 46: Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de leucocitos mononucleares (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,644$; $P=0,167$).

4.7.4. Análisis de correlación entre ambas técnicas sin considerar las muestras con elevado RCS

Debido a que la falta de correlación en los puntos 4.7.3.2.; 4.7.3.3. y 4.7.3.4. puede ser debida a los valores de RCS elevados, se realizaron nuevas correlaciones sin considerar datos de RCS >200.000 células/ml.

4.7.4.1. LPMN (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

La correlación realizada para el conteo de LPMN por IHQ y células CD14+ por CF fue significativa ($P<0,01$) obteniéndose un valor de coeficiente de correlación de Pearson obtenido cercano a 1 ($r=0,986$). La correlación obtenida para estos tipos celulares estudiados indica una relación lineal positiva entre los dos métodos aquí evaluados (figura 47).

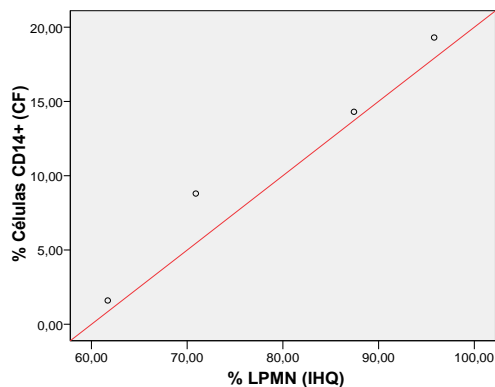


Figura 47: Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de LPMN (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,986$; $P < 0,01$)

4.7.4.2. LPMN y leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

La correlación realizada para el conteo de LPMN y leucocitos mononucleares por IHQ y células CD14+ por CF fue significativa ($P < 0,01$), obteniéndose un coeficiente de correlación cercano a 1 ($r = 0,992$). La correlación obtenida para estos tipos celulares estudiados indica una relación lineal positiva entre los dos métodos aquí evaluados. (figura 48).

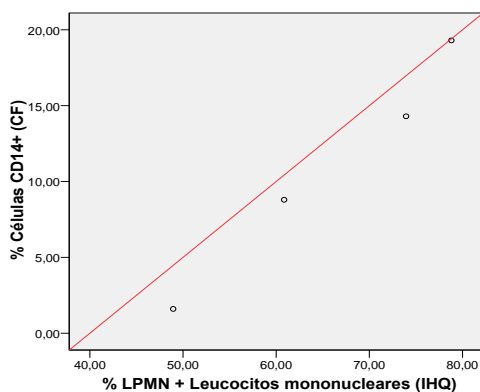


Figura 48: Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de LPMN y leucocitos mononucleares (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,992$; $P < 0,01$).

4.7.4.3. Leucocitos mononucleares (IHQ) vs. Células CD14+ (CF)

La correlación realizada para el conteo de leucocitos mononucleares mediante IHQ y células CD14+ (CF) no fue significativa ($P=0,334$), obteniéndose el siguiente coeficiente de correlación $r=0,666$. La correlación hallada para estos tipos celulares cuyo conteo se realizó mediante ambas técnicas no representa una relación lineal (figura 49).

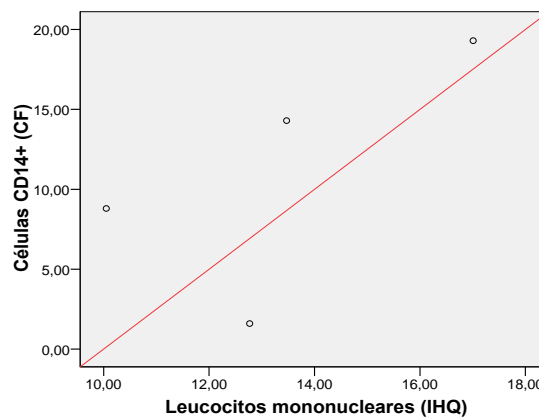


Figura 49: Dispersión que representa la correlación hallada entre el porcentaje de leucocitos mononucleares (IHQ) vs. el porcentaje de células CD14+ (CF) ($r = 0,666$; $P=0,334$).