

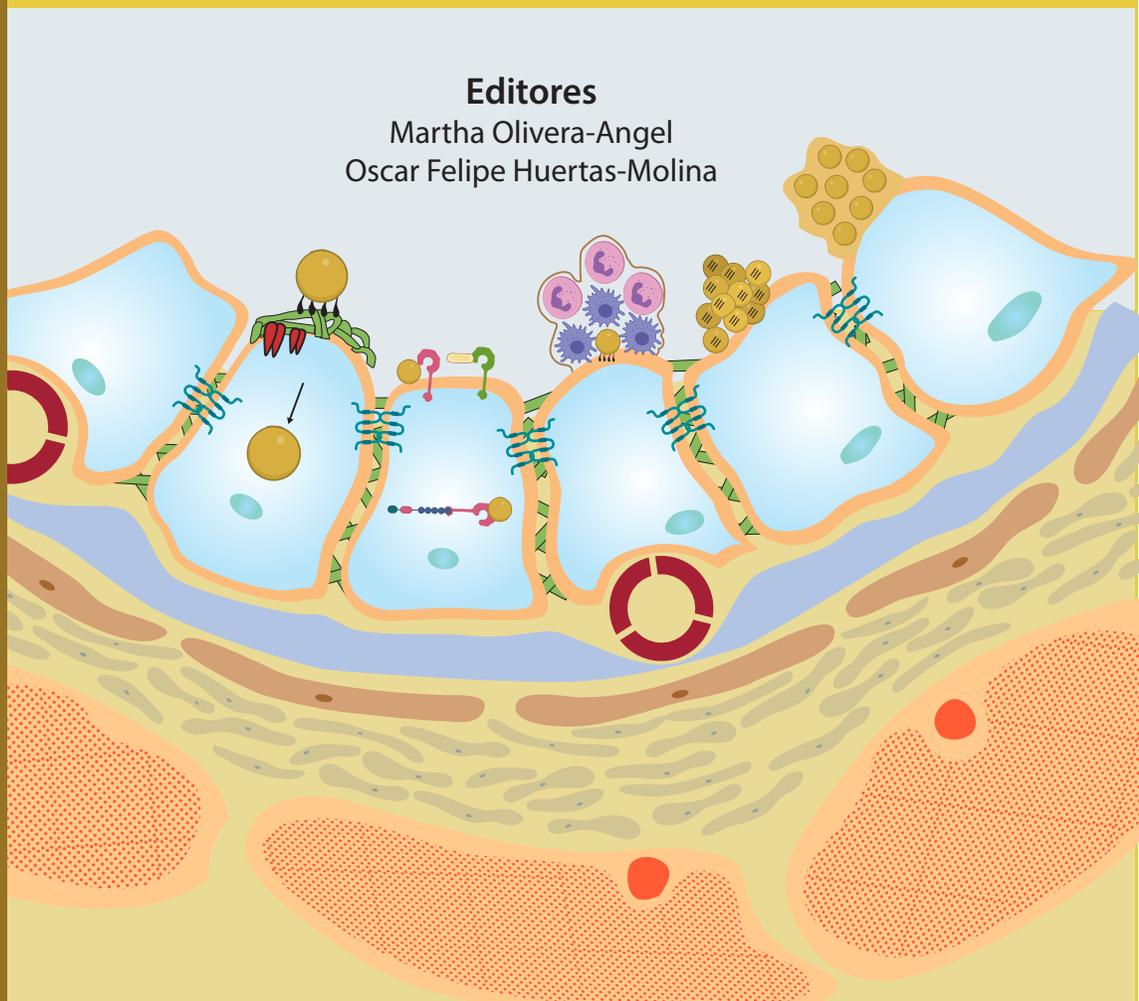
La lactancia

vista desde múltiples enfoques

Primera parte: biología e inmunología

Editores

Martha Olivera-Angel
Oscar Felipe Huertas-Molina



Ciencias Biológicas y Ciencias Animales



UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA

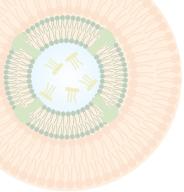
Facultad de Ciencias Agrarias



La lactancia vista desde múltiples enfoques

Primera parte: biología e inmunología





Primera edición: mayo de 2020

ISBNe: 978-958-5596-66-5

Editores

Martha Olivera-Angel

Oscar Felipe Huertas-Molina

Autores

Martha Olivera-Angel, DMV, Dr.Sci.Agr.
Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

Karen Vargas, MyB, MSc
Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

Víctor Guzmán, MV, MSc
Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

Oscar Felipe Huertas-Molina, MVZ, MSc, Esp.
Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia;
Agrosavia, San José del Nus, Antioquia.

Daniela Londoño, MV, Esp, MSc
Grupo de Investigación Biogénesis
Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

Orlando Diaz MVZ, MSc,
Grupo de investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia;
Grupo Solla S.A., Medellín, Colombia.

Luis Miguel Gomez MVZ, MSc, Dr. Sci.
Director de Investigación, Alura, Animal Health and Nutrition.

Juan Carlos Rodríguez Lecompte DVM, MSc, PhD
Department of Pathology and Microbiology, Atlantic Veterinary College, Molecular Immunology Laboratory, University of Prince Edward Island .

Giovanny Torres-Lindarte, ByLC, MSc. Dr. Sci.
Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia; Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES

Corrección de texto

Ari Velez

Ilustraciones

BLUE PIXEL SAS, Oficio Gráfico

Diseño y diagramación

Sandra María Arango, Oficio gráfico



Este obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento- No Comercial- Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



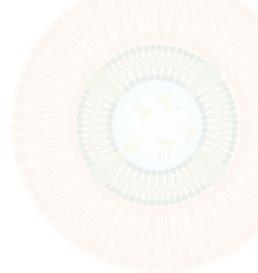
Carrera 75 # 65-87;
Teléfonos: (574) 219 91 76 - 219 91 77
Medellín, Colombia



Página Web



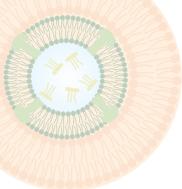
Facebook



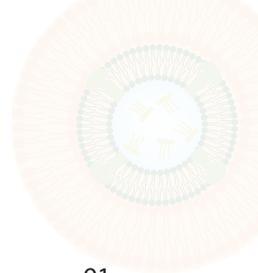
Contenido

Prefacio	7
I. Mamogénesis.....	9
1. Mamogénesis fetal.....	9
2. Mamogénesis neonatal.....	11
3. Control hormonal del feto durante el desarrollo embrionario.....	11
3.1 Mediadores locales de las acciones endocrinas en la mamogénesis.....	13
3.2 Factores de crecimiento durante la mamogénesis.....	14
Bibliografía.....	15
II. Calostrogénesis, digestión y absorción del calostro.....	17
1. Introducción.....	17
2. Génesis del calostro.....	18
3. Modelo de la génesis del calostro.....	20
4. Digestión del Calostro.....	23
5. Absorción de los Componentes del Calostro.....	23
Bibliografía.....	27
III. Lactogénesis.....	31
1. Introducción.....	31
2. Lactogénesis I, preparando la maquinaria.....	32
3. Lactogénesis II, secreción copiosa de leche.....	34
4. Hormonas del complejo lactogénico.....	34
5. Transporte de solutos y vías de secreción.....	35



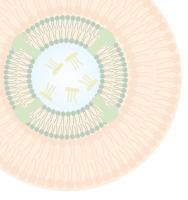


6. Elaboración y exocitosis de los tres grandes componentes de la leche.....	39
6.1 La lactosa	39
6.2 La proteína	43
6.3 Los lípidos.....	48
Bibliografía.....	52
IV. Galactopoyesis y Galactoquinesis	57
1. Introducción.....	57
2. Las hormonas.....	58
Bibliografía.....	66
V. Involución.....	69
1. Introducción.....	69
2. Involución reversible e irreversible	70
2.1 Remodelación de la matriz extracelular	72
3. Remodelación vascular	76
Bibliografía.....	77
VI. Receptores hormonales que afectan directa o indirectamente la función de la glándula mamaria	79
1. Introducción.....	79
2. Endocrinología de la glándula mamaria.....	80
3. Clasificación de los receptores de las secreciones endocrinas que regulan la glándula mamaria	81
3.1 Receptores de membrana	81
3.2 Receptores nucleares	86
Bibliografía.....	87
VII. Respuesta inmune innata de la glándula mamaria	89
1. Introducción.....	89



2. Defensas externas o barreras físicas del pezón	91
3. Defensas internas o intrínsecas.....	93
4. Mecanismos de defensa inducibles.....	93
Bibliografía.....	102
VIII. Infección y respuesta de la glándula mamaria bovina	105
1. Vía y mecanismos de ingreso de los patógenos mamarios	105
2. Reconocimiento inicial de la bacteria	107
3. Comportamientos de las bacterias dentro de la glándula mamaria	109
4. Respuesta inmune.....	111
4.1 Respuesta inmune innata	111
4.1.1. Células somáticas.....	111
4.2.2. Mecanismos efectores de los fagocitos.....	113
4.2.3. Producción de citoquinas y quimioquinas	114
4.2.4. Producción de péptidos y proteínas antimicrobianas.....	116
4.2 Inmunidad adaptativa.....	119
5. Mecanismos de patogenicidad y evasión de la respuesta inmune.....	122
5.1 <i>Escherichia coli</i>	122
5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	123
Bibliografía.....	131





La lactancia vista desde múltiples enfoques. Primera parte: biología e inmunología

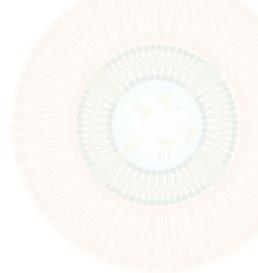
Martha Olivera-Angel y Oscar Felipe Huertas-Molina (Editores)

Fondo Editorial Biogénesis, 2020

Número de páginas

ISBNe: 978-958-5596-66-5

Prefacio. Mamogénesis. Calostrogénesis, digestión y absorción del calostro. Lactogénesis. Galactopoyesis y galactoquinesis. Involución. Receptores hormonales que afectan directa o indirectamente la función de la glándula mamaria. Respuesta inmune innata de la glándula mamaria. Infección y respuesta de la glándula mamaria

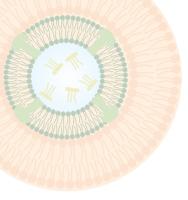


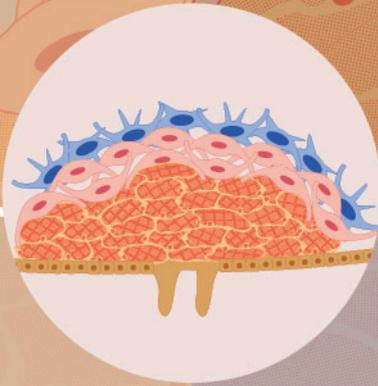
Prefacio

¿Cómo se desarrolla la glándula?, ¿cómo empieza la producción de calostro y la secreción de leche?, ¿cómo entra en latencia la glándula y posteriormente reinicia el ciclo lactogénico?, ¿cómo se relaciona la glándula con el medio externo y en particular con los microorganismos potencialmente patógenos? A través del curso de posgrado “Fisiología de la Lactancia” y ahora con este libro, el grupo de investigación Biogénesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia ha estado contribuyendo a responder a estas y otras preguntas relacionadas con el funcionamiento celular y molecular de la glándula mamaria, que es parte del sistema reproductivo y elemento fundamental de la industria láctea.

Este libro pretende llenar una necesidad sentida de la comunidad académica nacional, así como contribuir a la educación continua de médicos veterinarios y zootecnistas, particularmente en aspectos patológicos y productivos.







Capítulo 1

Mamogénesis

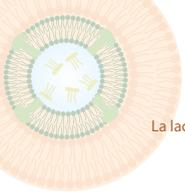
M. Olivera-Angel¹MV, Dr.Sci.Agr. K.Vargas MyB MSc.

1. Mamogénesis fetal

La mamogénesis comienza entre las 18 y 19 semanas de vida intrauterina, tiempo en el cual se pueden reconocer los brotes mamarios epidérmicos que llegan hasta la mesénquima celular. Estos brotes se ubican en una región llamada “línea de leche”, paralela al tórax. El desarrollo se inicia con la aparición de los primeros rudimentos de glándula y el sistema de ductos; este desarrollo es dirigido principalmente por hormonas como la prolactina (Prl), la hormona del crecimiento (GH) y por factores como la proteína morfogenética ósea (BMP4) y el factor de transcripción T-BOX 3 (Figura 1). La interacción entre estos últimos tres genera un estímulo positivo a las células tallo para que se rodeen en un panículo adiposo. La hormona paratiroidea estimula los adipocitos para su crecimiento, la mitosis y la formación del panículo. La yema mamaria aparece

1. Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia.



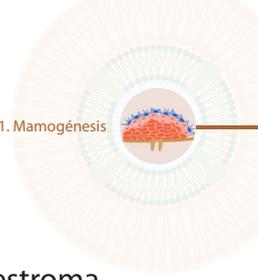


por la acción de factores como el TBX3, los factores de crecimiento de fibroblastos (FCF2B y FCF10), el factor de unión linfoide (LEF1), las homeoproteínas (MSX1/2) y los dedos de zinc (GLI2) (Weaver & Hernandez, 2016, Pechoux, 1994).

En el ectodermo del feto las líneas mamarias son visibles desde el día 35. Alrededor del tercer mes se evidencian los canales mamarios, se forman los ductos excretorios y luego los alvéolos (Figura 1 y 2). Todo el sistema excretor de la glándula mamaria esta completo al final del segundo trimestre del feto; la glándula mamaria madura está compuesta por múltiples alvéolos y conductos lo que la clasifica como una glándula alveolar compuesta y ramificada (Figura 2) (Veltmaat, Mailleux, Thiery & Bellusci, 2003).

La presencia de la almohadilla grasa que recubre los ductos primarios influye en la proliferación y en la diferenciación de las células epiteliales mamarias (CEM) a través de la transmisión de los mensajes inducidos por la unión de receptor y ligamiento tanto de los esteroides ováricos como de la GH (Yart, Lollivier, Marnet & Dessauge, 2014). La almohadilla grasa responde a este estímulo hormonal sintetizando varios factores de crecimiento con efectos mitóticos como el factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el factor de crecimiento del hepatocito (HGF) (Meyer, Capuco, Boisclair & Amburgh, 2006) (Figura 1).

Las células epiteliales no tienen receptores para los esteroides ováricos, pero el estroma sí. Estos receptores intracelulares (R) presentan las variables α y β : R α promueve la proliferación celular mientras que R β la regula. La porción R α es la de mayor expresión en las primeras fases de la mamogénesis, luego aumenta el R β . Este cambio en las variantes podría deberse a una combinación de hormonas esteroideas y factores de



crecimiento: el estradiol aumenta la producción de IGFI en el estroma, lo que sugiere que el estímulo por parte de los estrógenos para la expresión de receptores está mediado de forma paracrina, de una célula de receptor positivo a una célula de receptor negativo (Ellis & Capuco, 2002; Capuco, Ellis, Wood, Akers & Garrett, 2002).

El canal del pezón del feto tiene receptores que inducen la apoptosis de las estructuras epiteliales. A estos receptores se adhiere la testosterona producida por el feto macho; como en la hembra no se produce testosterona, los receptores no ejercen ninguna función (Rey, 2001).

2. Mamogénesis neonatal

Inmediatamente después del nacimiento, la glándula crece en forma isométrica y cerca de la pubertad inicia el crecimiento alométrico. La prolactina (Prl) y los esteroides ováricos controlan el desarrollo de los ductos en el parénquima mamario (almohadilla grasa y estroma) al inducir su crecimiento (Yart et al., 2014) (Figura1).

3. Control hormonal del feto durante el desarrollo embrionario

Se cree que el crecimiento mamario se da debido a la disminución de las concentraciones de progesterona —que el cuerpo lúteo ha mantenido altas durante toda la gestación— y al aumento del estradiol hacia el final de la gestación. La prolactina parece tener un papel permisivo ya que no se encuentra ningún cambio en sus niveles asociado a la mamogénesis y a la formación del lóbulo alveolar durante la gestación. Con respecto a la GH se ha determinado que abunda la expresión de sus receptores en los ductos epiteliales y alveolares cuando la glándula se está diferenciando.



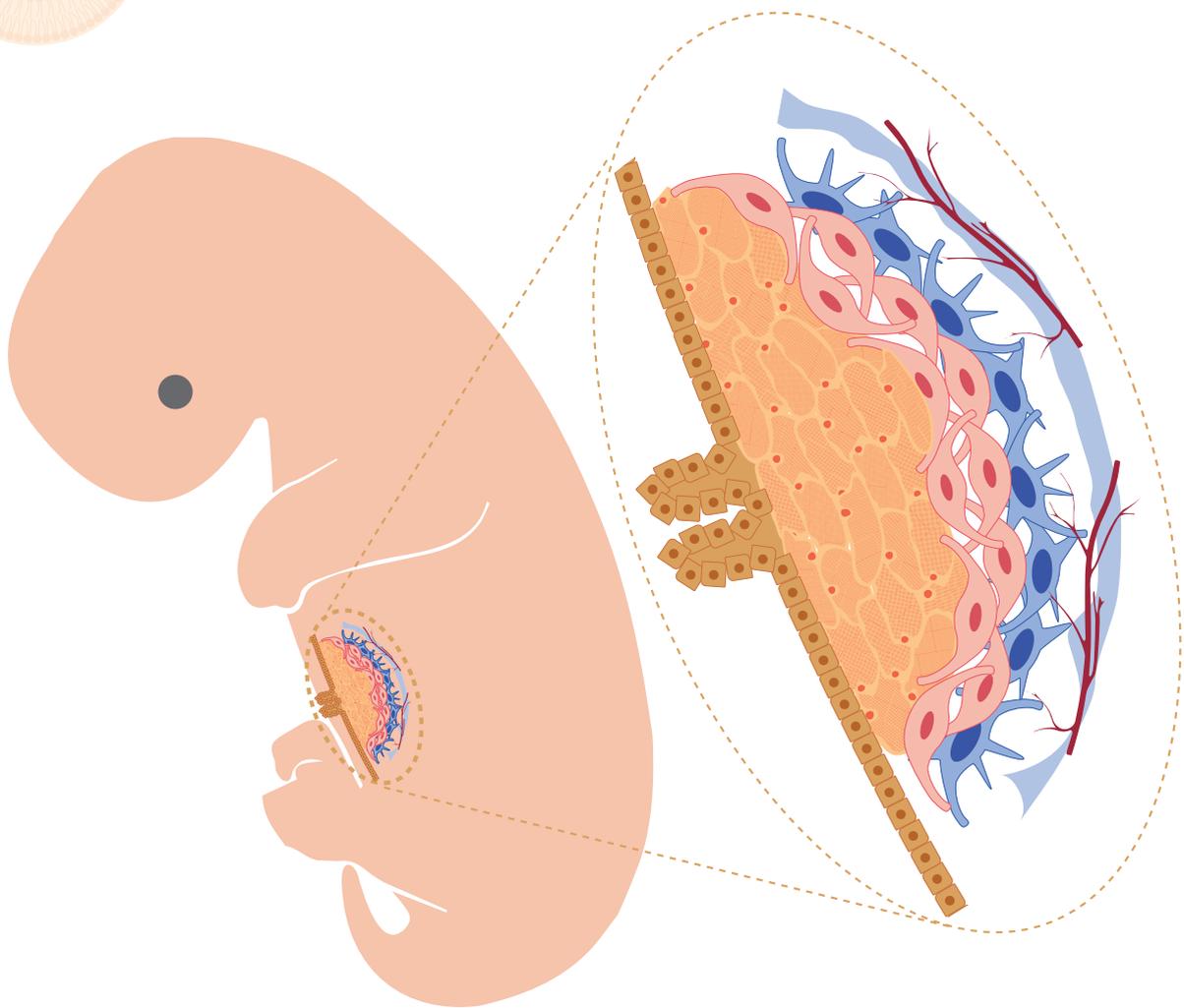
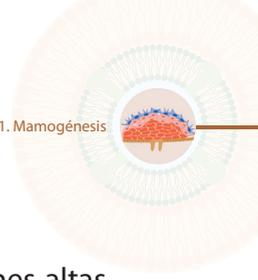


Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria en el feto

Fuente: K. Vargas, 2019

Convenciones:





do, pero el papel que juega aún no es claro. Las concentraciones altas de mRNA para IGF-I al final de la gestación parecen determinar que la acción local de esta media en la mamogénesis (Plath-Gabler, Gabler, Sinowatz, Berisha & Schams, 2001). La hormona tiroidea y los esteroides hormonales parecen mejorar los efectos de las hormonas esteroideas ovárica, pero no se les conoce una función directa (Figura 2) (Sinowatz et al., 2000).

3.1 Mediadores paracrinos locales de las acciones endocrinas en la mamogénesis

El estroma es tejido conectivo reticular y su función es fundamental: dar soporte al desarrollo del tejido epitelial del embrión en el proceso de mamogénesis. Después del nacimiento, la glándula mamaria de la hembra tiene un tejido adiposo llamado almohadilla grasa, un estroma que es la matriz tanto del tejido conectivo como de la grasa. El estroma tiene dos funciones principales: contener el tejido vascular y simpático y proveer una matriz tridimensional y la membrana basal. Además, es el sitio local de la acción hormonal, la síntesis lipídica y la síntesis de factores de crecimiento (Figura 2) (Hovey, Mcfadden & Akers, 1999).

Investigaciones en terneras y novillas han demostrado que un buen plan de alimentación induce a una abundancia de estroma y de parénquima. Esto se debe a las mayores concentraciones de leptina circulante, que a su vez son inducidas por la producción de adipoquinas que realiza la almohadilla grasa (Palin, Farmer & Duarte, 2017).

3.2 Factores de crecimiento durante la mamogénesis

Aparentemente las hormonas no actúan de manera directa: su efecto puede ser potenciador o inhibidor y está mediado por los factores de



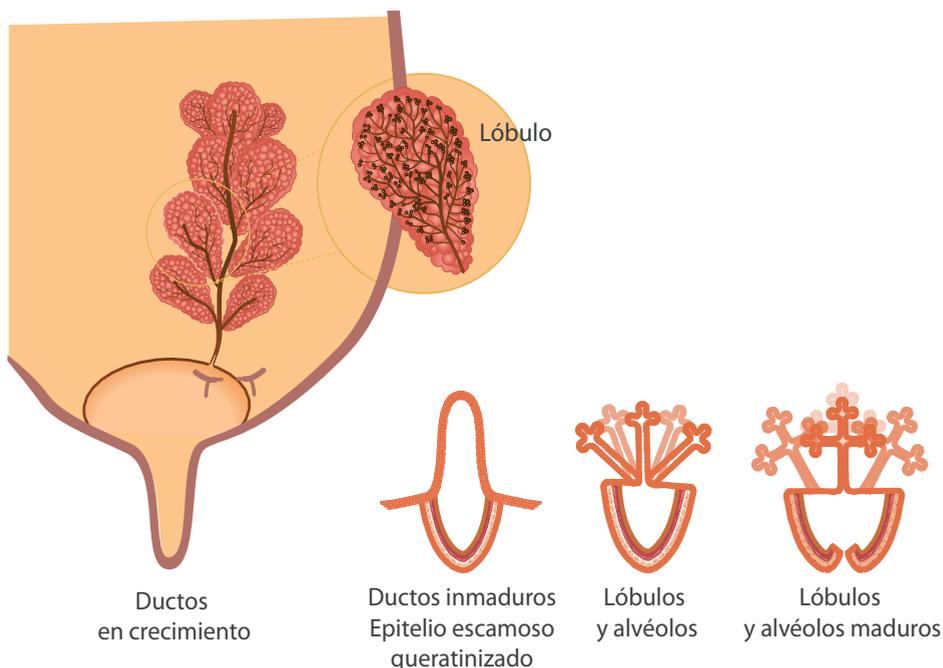
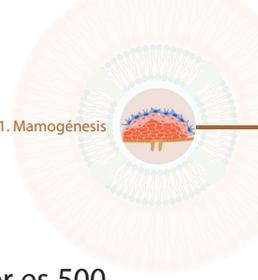


Figura 2. Maduración de los conductos mamarios

Fuente: K. Vargas, 2019

crecimiento como TGF α y TGF β , IGF1 e IGF2, EGF, FGF (Chepko & Smith, 1999). El estudio de la acción de estos factores de crecimiento ha llevado a generar la hipótesis de que la TGF actúa sobre la proliferación de las células ductales en la glándula mamaria prepuberal y da origen a dos tipos de células progenitoras: una capaz de producir hijas que van a formar el ducto y otras que van a formar los alvéolos y lóbulos que secretaran la leche. En rumiantes se encontró la expresión de receptores TGF β -1R (Maple, Akers & Plaut, 1998).

La acción de la IGF1 sobre la proliferación del tejido mamario es clara: se da mediante el receptor IGF1R, muy parecido al receptor de la insulina. Este receptor tiene una estructura heterodimérica α y β . La IGF1 es



producida por el estroma y la unión que genera con su receptor es 500 veces más fuerte que aquella formada por la insulina y su receptor.

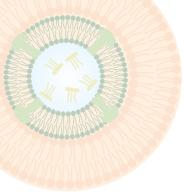
Con el recuento de mRNA para EGF, TGF- α y para la anfiregulina se ha demostrado la acción de la EGF en la mamogénesis. Sin embargo, sus acciones mitogénicas no se han podido esclarecer (Pechoux, Clezardin & Dante, 1994).

El factor transformador de crecimiento β (TGF β) puede promover indirectamente la proliferación de las células del mesénquima e inhibir el crecimiento de las células epiteliales.

Bibliografía

- Capuco, A. V., Ellis, S., Wood, D. L., Akers, R. M., & Garrett, W. (2002). Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves. *Tissue and Cell*, 34(3), 143–154.
- Chepko, G., & Smith, G. H. (1999). Mammary epithelial stem cells: our current understanding. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4(1), 35–52.
- Ellis, S., & Capuco, A. V. (2002). Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue and Cell*, 34(3), 155–163.
- Hovey, R. C., Mcfadden, T. B., & Akers, R. M. (1999). Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4(1), 53–68.
- Maple, R. L., Akers, R. M., & Plaut, K. (1998). Effects of steroid hormone treatment on mammary development in prepubertal heifers. *Domestic Animal Endocrinology*, 15(6), 489–498.
- Meyer, M. J., Capuco, A. V., Boisclair, Y. R., & Amburgh. (2006). Estrogen-dependent responses of the mammary fat pad in prepubertal dairy heifers. *Journal of Endocrinology*, 190(3), 819–827. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06883>
- Palin, M., Farmer, C., & Duarte, C. (2017). Triennial lactation symposium/bolfa: Adipokines affect mammary growth and function in farm animals. *Journal of Animal Science*, 95(12), 5689–5700.





- Pechoux C, Clezardin P, Dante R, et al. (1994). Localization of thrombospondin , CD36 and CD51 during prenatal development of the human mammary gland. *Pedersen*, 57, 133.
- Plath-Gabler, A., Gabler, C., Sinowatz, F., Berisha, B., & Schams, D. (2001). The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. *Journal of Endocrinology*, 168(1), 39–48.
- Rey, R. (2001). Diferenciación sexual embrio-fetal: de las moléculas a la anatomía. *Revista Chilena de Anatomía*, 19(1), 75–82. <https://doi.org/10.4067/S0716-98682001000100012>
- Sinowatz, F., Schams, D., Kolle, S., Plath, A., Lincoln, D., & Waters, M. J. (2000). Cellular localisation of GH receptor in the bovine mammary gland during mammogenesis, lactation and involution. *Journal of Endocrinology*, 166(3), 503–510.
- Veltmaat, J. M., Mailleux, A. A., Thiery, J. P. & Bellusci, S. (2003). Mouse embryonic mammosgenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation*, 71(1), 1–17.
- Weaver, S. R., & Hernandez, L. L. (2016). Autocrine-paracrine regulation of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 842–853. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-9828>
- Yart, L., Lollivier, V., Marnet, P. G., & Dessauge, F. (2014). Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants. *Animal*, 8(1), 72–85. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001638>

An illustration showing a cross-section of a placenta and a fetus. The placenta is shown with various blood vessels and cells, and the fetus is shown in a curled position. The word 'Capítulo' is written in white, and a large number '2' is written in white to the right of the word.

Capítulo 2

Calostrogénesis, digestión y absorción del calostro

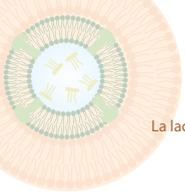
Víctor Guzmán¹ MV, M.Sc, Martha Olivera-Angel¹ MV, Dr.Sci.Agr.

1. Introducción

La placenta sindesmocorial de la vaca forma un sincitio (o sincisio) entre el endometrio materno y el feto, separando los suministros de sangre materna y fetal, por lo cual el paso de moléculas de inmunoglobulinas es restringido. En consecuencia, los terneros recién nacidos, durante sus primeras horas de vida, son dependientes de la transferencia pasiva de inmunoglobulina G (IgG) que tiene el calostro materno (Weaver, Tyler, VanMetre, Hostetler & Barrington, 2000).

1. Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia





Para evitar la falla de transferencia de inmunidad pasiva (FTP) y sus consecuencias, el ternero debe consumir 4 litros de calostro que contenga por lo menos 50 gr de IgG por litro antes del “cierre” de la absorción no selectiva intestinal (Godden, 2008; Weaver et al., 2000).

Cuando el neonato no ingiere o no absorbe suficientes cantidades de IgG del calostro y, por lo tanto, las concentraciones de estas en sangre son inferiores a 10mg/ml, ocurre la FTP (McGuirk & Collins, 2004); esta conduce a una falla en la activación y regulación de las respuestas inmunes innatas presentes en los terneros para combatir infecciones (Chase, Hurley, & Reber, 2008). Los terneros necesitan ingerir entre 100 y 200 gr de IgG para mejorar las posibilidades de éxito en la transferencia pasiva (Buczinski & Vandeweerd, 2016). La FTP se considera un factor de riesgo predisponente para la morbilidad y mortalidad neonatal asociada con septicemia, diarrea y neumonía (Godden, 2008).

Deben ocurrir una serie de eventos fisiológicos para que el fenómeno de la transferencia pasiva logre proteger al ternero de los agentes patógenos presentes en el medio ambiente.

2. Génesis del calostro

El calostro bovino consiste en una mezcla de secreciones lácteas y de componentes del suero sanguíneo que se acumulan en la glándula mamaria entre 3 y 4 semanas antes del parto (Baumrucker & Bruckmaier, 2014). Los componentes del calostro incluyen inmunoglobulinas, leucocitos maternos, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, factores antimicrobianos, agua y nutrientes. La proteína compone el 14% del calostro, una concentración 4,5 veces superior a la leche normal (que contiene 3,1%). Aunque las proteínas más abundantes del calostro son las inmunoglobulinas, la cantidad de albumina es 8 veces mayor y la caseína 4,8 ma-



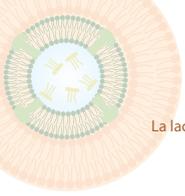
yor que en la leche. La lactosa está sobre la mitad del contenido normal de la leche. Las concentraciones de muchos de estos componentes son mayores en las primeras secreciones después del parto (primer ordeño del calostro), luego disminuyen constantemente durante los siguientes seis ordeños (leche de transición) hasta alcanzar las concentraciones más bajas que se miden rutinariamente en la leche entera (Godden, 2008).

El calostro del bovino contiene más de 1×10^6 células/mL de leucocitos maternos inmunológicamente activos, incluyendo principalmente macrófagos, que comprenden del 40 al 50% de los leucocitos calostrales, los restantes son linfocitos (22 a 25%) y neutrófilos (25 a 37%). Los resultados de un estudio realizado por Donovan (2007) sugieren que los leucocitos calostrales liberan citoquinas y mejoran la respuesta de los linfocitos a agentes no específicos, aumentan la fagocitosis y la capacidad de matar bacterias y estimulan respuestas inmunes humorales (Donovan et al., 2007). El calostro también contiene una serie de factores antimicrobianos como la proteína antimicrobiana de unión al hierro llamada lactoferrina, la enzima antibacteriana lactoperoxidasa, la lisozima enzimática antibacteriana y lítica, los oligosacáridos que funcionan como análogos de ligandos microbianos sobre superficies mucosas y péptidos antimicrobianos estables al calor (defensinas). (Wheeler, Hodgkinson, Prosser, & Davis, 2007).

Además, están presentes algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β -2 (TGF- β 2), la hormona de crecimiento (GH) y la insulina. El factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) presente en el calostro puede ser un regulador clave en el desarrollo del tracto gastrointestinal de neonatos bovinos, incluida la estimulación del crecimiento de la mucosa y el aumento del tamaño de las vellosidades (Hurley & Theil, 2011; Godden, 2008).

En los rumiantes, la IgG es la inmunoglobulina predominante en la leche y el calostro y representa entre el 65 y el 90% de los anticuerpos tota-





les. Se ha demostrado que la IgG es transportada a la glándula mamaria desde el suero, mientras que la inmunoglobulina A (IgA) es sintetizada en la glándula mamaria por las células plasmáticas que migran desde el tracto gastrointestinal. Los precursores de las células plasmáticas destinadas a producir IgA tienen origen en el tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) y el tráfico a la glándula mamaria se da vía sanguínea cerca del momento del parto. La IgA se encuentra en las secreciones mucosas y evita infecciones causadas por microbios en estas superficies.

La inmunoglobulina M (IgM), también presente en el calostro, aparece cuando un organismo se expone a un antígeno por primera vez; tiene una especificidad baja y por lo tanto una menor potencia para vencer la infección (Hurley & Theil, 2011; Stelwagen et al., 2009). Algunos autores sostienen que la tasa de transferencia de IgG a la glándula mamaria antes del parto es una consecuencia del desarrollo de la misma, la cual está bajo el control de estrógeno, progesterona y prolactina días antes del parto (Barrington, McFadden, Huyler & Besser, 2001). El análisis inmunohistoquímico demostró la expresión de un receptor llamado receptor neonatal Fc (FcRn) que coincide con la lactogénesis I e inicio de la calostrogénesis; este receptor disminuye durante la lactogénesis II (el inicio de la secreción abundante de leche) Cervenak & Kacs Kovics, 2009).

3. Modelo de la génesis del calostro

Durante la lactogénesis I, la glándula mamaria produce el calostro materno aproximadamente desde la tercera semana antes del parto (Roth & Smith, 2004), debido a la baja concentración de estrógenos y prolactina y alta concentración de progesterona. Para llevar la IgG sérica circulante al lumen, la célula epitelial mamaria expresa el receptor específico FcRn neonatal, que media el paso desde el espacio extracelular en el extremo



basal de la célula al lumen alveolar mamario. La unión del ligando con el receptor de alta afinidad (IgG-FcRn) se da a un pH menor de 6,5, en uno mayor a 7 se da uno débil o ninguna (Cervenak & Kacs Kovics, 2009). Una vez ocurre la unión de la IgG con el receptor FcRn se da el tránsito intracelular y la IgG es transportada al extremo apical, el receptor es reciclado y queda habilitado nuevamente (Figura 1, numeral 2). Las células epiteliales alveolares dejan de expresar este receptor al inicio de la lactancia, probablemente en respuesta al aumento de las concentraciones de prolactina (Godden, 2008).

De manera similar, la IgA, disponible en la glándula mamaria por la presencia de células plasmáticas que migraron provenientes de TLAI, hace tránsito por la CEM. El transporte de IgA implica la unión al receptor denominado receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR) en la membrana celular basolateral, para que luego sea transportada hacia la membrana apical (Figura 1, numeral 3). Una vez en el lumen, el pIgR libera la IgA y un fragmento llamado componente secretor (CS) que continúa unido a la IgA.

El CS confiere a la IgA protección contra la degradación proteolítica en el intestino y facilita la localización de IgA en el moco intestinal. También tiene efectos protectores propios, como bloquear potencialmente la adhesión epitelial de *E. coli* enterotoxigénica y neutralizar los efectos de otros patógenos como el rotavirus causante de diarrea neonatal (Hurley & Theil, 2011; Parreño et al., 2004; Wheeler, Hodgkinson, Prosser, & Davis, 2007).

El ingreso de células inmunes como los macrófagos (presentes en la glándula mamaria) al calostro se da por diapédesis entre las uniones estrechas de las células epiteliales de la glándula (Figura 1, numeral 1) (Baumrucker & Bruckmaier, 2014). Una vez ocurre el parto, el ternero



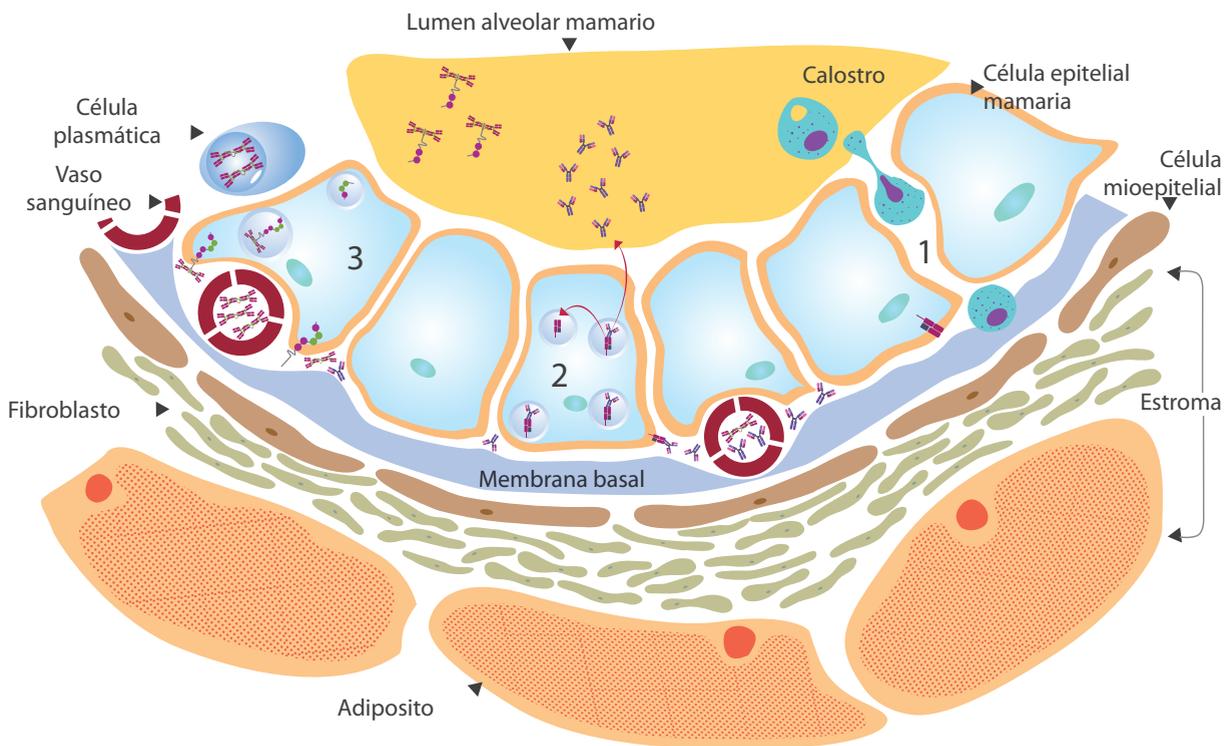


Figura 1. Fenómeno de transcitosis de IgG e IgA.

Paso de macrófagos del tejido mamario al calostro: **1.** Paso de macrófago del tejido mamario al lumen alveolar. **2.** Tránsito de IgG y reciclaje de receptor FcRn. **3.** Tránsito de IgA unida al componente secretor.

Fuente: V. Guzmán 2017

Convenciones

Legend for the diagram components:

- FcRn (purple Y-shaped receptor)
- IgA (pink Y-shaped antibody)
- IgG (black Y-shaped antibody)
- Macrófago (blue cell with purple nucleus)
- pIgR (green and purple secretory component)

toma y digiere el calostro, el cual debe conservar el potencial biológico de sus componentes, pues deben llegar habilitados al intestino para su posterior absorción.



4. Digestión del calostro

El calostro, compuesto de secreciones lácteas y de componentes del suero sanguíneo, atraviesa la gotera esofágica del ternero y, como resultado, la leche ingerida no pasa ni por el retículo ni por el rumen sino que fluye directamente al abomaso (Braun, Krüger & Hässig, 2013). La renina secretada en el abomaso de los neonatos convierte a la caseína soluble, una de las proteínas de mayor tamaño y abundancia del calostro, en una red de paracaseinato de calcio que retiene los glóbulos grasos y se coagula en pocos minutos. Este coágulo se retrae rápidamente y se segregan otros sustratos que componen el suero del calostro, en este caso similares a los del suero de la leche. Como consecuencia, la caseína se retiene en el estómago del recién nacido más tiempo que el resto de las proteínas del suero (Figura 2).

En el abomaso el calostro se divide en dos fracciones: (i) el coágulo formado por caseínas y grasa y (ii) el suero formado por lactosa y minerales y otras proteínas de la leche, como inmunoglobulinas y lactoglobulinas. (Hurley & Theil, 2011; Miyazaki, Okada & Miyazaki, 2017; Relling & Mattioli, 2003). El suero, rico en IgG, pasa rápidamente del estómago al intestino delgado sin degradar; no se usa como fuente de alimento debido a la baja actividad proteolítica y a la presencia de un inhibidor de tripsina, que es 100 veces mayor en el calostro que en leche (Godden, 2008).

5. Absorción de los componentes del calostro

La absorción intestinal en el período inmediato al nacimiento es transitoria y no selectiva. Durante las primeras 24 a 36 horas de vida, el intestino delgado está revestido con células epiteliales, mucosas inmaduras (enterocitos) altamente vacuoladas y capaces de absorber macromoléculas. Los enterocitos inmaduros no son selectivos, absorben proteí-



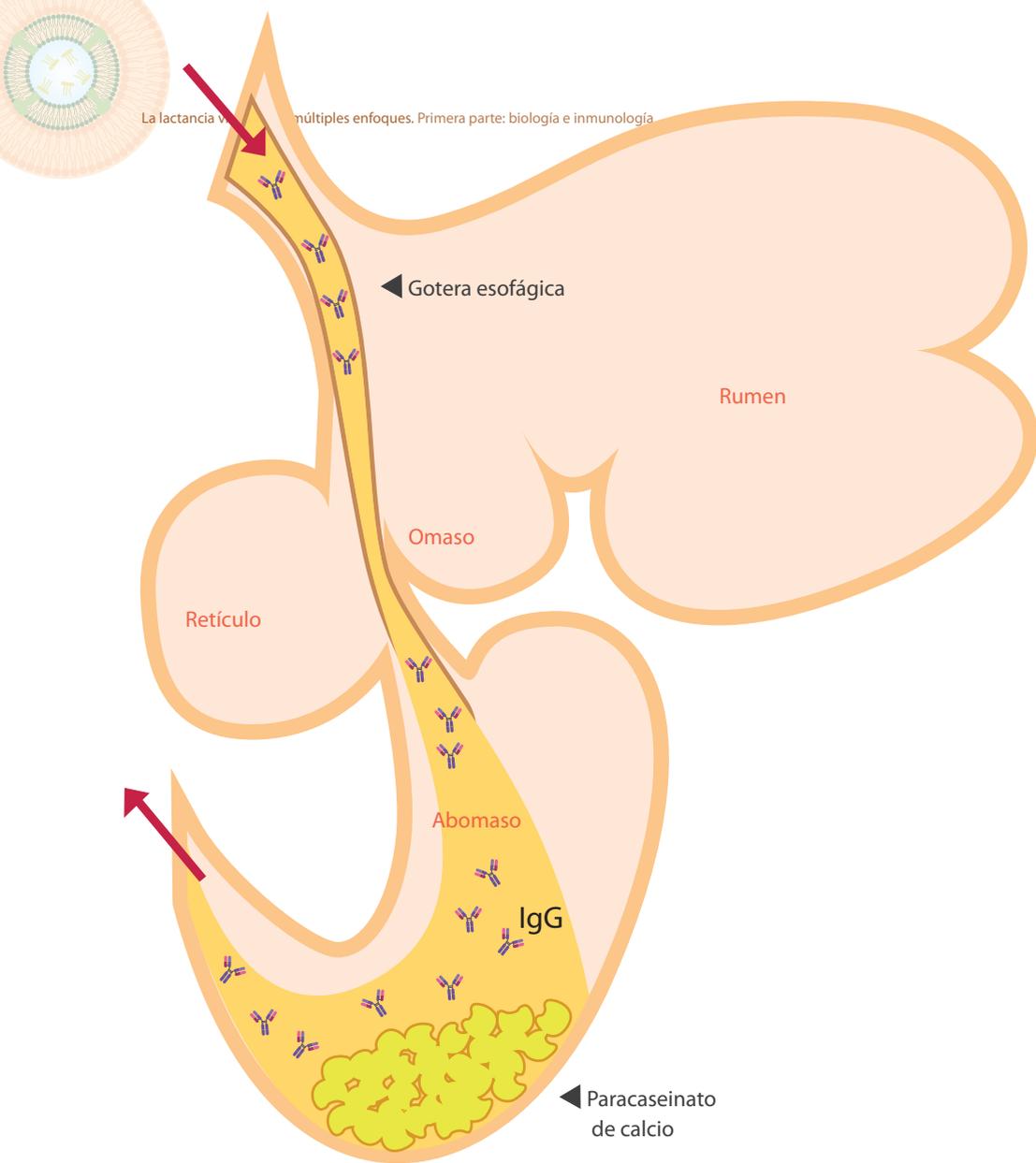


Figura 2. Paso del calostro a través de la gotera esofágica hacia abomaso, separación de la IgG y posterior paso al intestino.

Fuente: V. Guzmán 2017

nas de gran peso molecular y otras moléculas. El epitelio intestinal del ternero recién nacido conserva la capacidad para hacer pinocitosis con macromoléculas por un período corto antes de que sea reemplazado por las células epiteliales maduras (Figura 3). En los enterocitos se observan numerosas vacuolas transportadoras que llevan IgG e IgA del ex-



tremo apical a la membrana basal (Figura 3 numeral 1, numeral 2). Este movimiento permite el paso de IgG a los capilares y luego vía portal a la circulación general del neonato (Cervenak & Kacs Kovics, 2009; Hurley & Theil, 2011; Kruse, 1983).

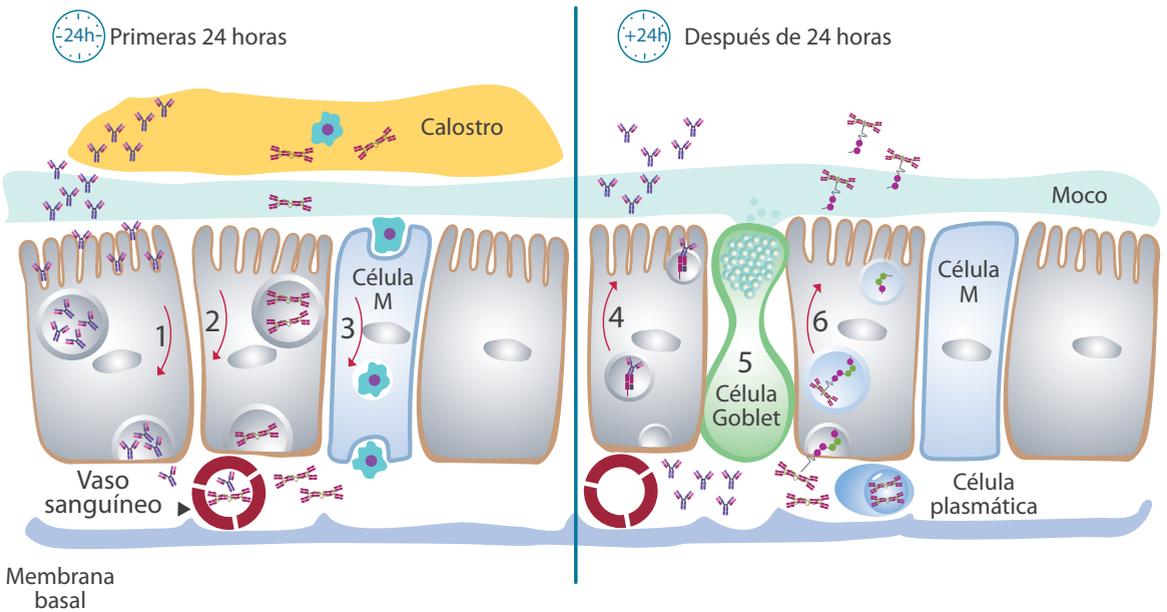
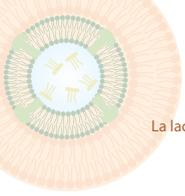


Figura 3. Absorción de la IgG e IgA del calostro en el intestino delgado. A. Intestino delgado en las 24 primeras horas: **1.** paso de IgG por pinocitosis en grandes vacuolas, **2.** paso de IgA por pinocitosis en grandes vacuolas, **3.** paso del macrófago por célula "M". B. Intestino delgado posterior a las 24 horas: **4.** reabsorción de IgG desde la circulación general de vuelta al lumen intestinal, **5.** célula de goblet productora de moco, **6.** paso de IgA al lumen.

Fuente: V. Guzmán 2017

Convenciones





Las macromoléculas absorbidas se liberan en la lámina propia y luego pasan a la circulación linfática o portal. Otros elementos como los leucocitos, provenientes del calostro, ingresan a través del intestino por medio de las células M de la mucosa intestinal, las cuales están especializadas en hacer pinocitosis con antígenos del lumen intestinal. Las células M son las encargadas de internalizar y entregar las células inmunes a los folículos asociados al epitelio (FAE) en las placas de Peyer intestinales (Figura 3 numeral 3) (Liebler-Tenorio, Riedel-Caspari, & Pohlenz, 2002). Estas células desaparecen de la circulación neonatal entre 24 y 36 horas post ingestión (Godden, 2008).

Poco a poco los enterocitos dejan de absorber las macromoléculas. El proceso de cese del paso indiferenciado de moléculas y elementos por la mucosa se denomina "cierre". Con el "cierre" se activa la barrera intestinal que, como estructura, cumplirá con sus funciones de captación de nutrientes o exclusión de patógeno y así se convierte en la primera línea de defensa contra patógenos entéricos (Roth & Smith, 2004). El transporte de IgG a través del enterocito parece ser bidireccional, lo cual apoya la teoría de que la IgG en el intestino está implicada también en la vigilancia inmune y defensa de la mucosa (Hurley & Theil, 2011).

Una gran proporción de la IgG ingerida se recicla hacia el lumen intestinal (Figura 1, numeral 4) donde contribuye a la protección del tracto gastrointestinal contra la infección. Un ternero que consume 100 gr de IgG del calostro puede secretar de nuevo en el intestino entre 2 y 4 gr de IgG cada día durante las primeras dos semanas de vida (Figura 3, numeral 4). Esta cantidad de inmunoglobulina podría reducir la probabilidad de enfermedad entérica del ternero (Besser, 1987). La inducción de la secreción de IgA a nivel intestinal está relacionada con la placa de Peyer y depende de la interacción entre células B y T y células dendríticas presentes en el FAE (Salmon, 1999).



La IgA producida ya localmente por las células plasmáticas asociadas a TLAI se transporta hacia el lumen a través de células epiteliales intestinales unidas al receptor polimérico de inmunoglobulina (Figura 3 numeral 6) (Tizard, 2013). Esta IgA en el intestino se une a las bacterias, toxinas y otras macromoléculas, limitando su capacidad para unirse a las células (Hurley & Theil, 2011).

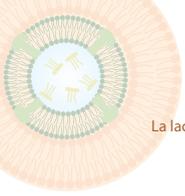
En el epitelio intestinal maduro se encuentran, además de los enterocitos, las células de Globet o caliciformes, encargadas de producir el moco que recubre el intestino (Figura 3 numeral 5) y que sirve no solo de barrera física contra antígenos, sino que tiene funciones antiinflamatorias que previenen la acción que las bacterias pudieran desencadenar si estuviesen en contacto con la mucosa.

En conclusión, se pueden definir tres etapas del calostro: la calostrogénesis en la vaca, la digestión del calostro en el estómago verdadero del neonato y finalmente su absorción en el intestino del ternero. El calostro tiene un efecto importante en la sobrevivencia y salud del neonato debido a que le provee defensas contra los agentes a los que puede estar expuesto, especialmente los de mucosas gástricas y respiratorias.

Bibliografía

- Barrington, G. M., McFadden, T. B., Huyler, M. T., & Besser, T. E. (2001). Regulation of colostrogenesis in cattle. *Livestock Production Science*, 70(1–2), 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00201-9)
- Baumrucker, C. R., & Bruckmaier, R. M. (2014). Colostrogenesis: IgG1 transcytosis mechanisms. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 19(1), 103–117. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9313-5>



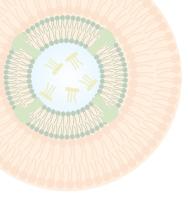


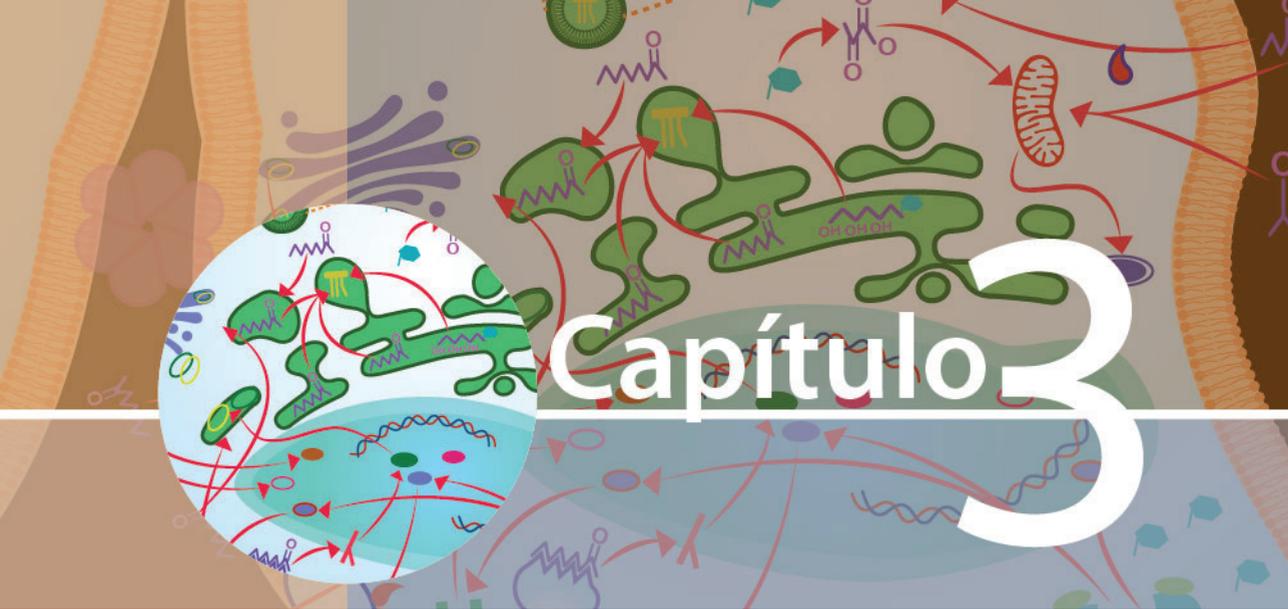
- Besser, T. E. (1987). The transfer of serum IgG1 antibody into the gastrointestinal tract in new born calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 17 (1987} 51-56, 17(Gay 1983), 51–56.
- Braun, U., Krüger, S., & Hässig, M. (2013). Ultrasonographic examination of the reticulum, rumen, omasum and abomasum during the first 100days of life in calves. *Research in Veterinary Science*, 95(2), 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.03.019>
- Buczinski, S., & Vandeweerd, J. M. (2016). Diagnostic accuracy of refractometry for assessing bovine colostrum quality: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7381–7394. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10955>
- Cervenak, J., & Kacskovics, I. (2009). The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1–3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.300>
- Chase, C. C. L., Hurley, D. J., & Reber, A. J. (2008). Neonatal immune development in the calf and Its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 24(1), 87–104. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.11.001>
- Donovan, D. C., Reber, A. J., Gabbard, J. D., Aceves-Avila, M., Galland, K. L., Holbert, K. A., ... Hurley, D. J. (2007). Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, 68(7), 778–782. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.7.778>
- Godden, S. (2008). Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 24(1), 19–39. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3(4), 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>
- Kruse, P. E. (1983). The importance of colostrum immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Annales de recherches vétérinaires*, 14(4), 349–353. Recuperado de http://www.vetres-archive.org/file/Vet.Res._0003-4193_1983_14_4_ART0003.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6677175
- Liebler-Tenorio, E. M., Riedel-Caspari, G., & Pohlenz, J. F. (2002). Uptake of colostrum leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85(1–2), 33–40. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00404-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00404-4)



- McGuirk, S. M., & Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20(3 SPEC. ISS.), 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.005>
- Miyazaki, T., Okada, K., & Miyazaki, M. (2017). Short communication: Neonatal calves coagulate first-milking colostrum and produce a large curd for efficient absorption of immunoglobulins after first ingestion. *Journal of Dairy Science*. 100 (9), 7262-7270. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12808>
- Parreño, V., Béjar, C., Vagnozzi, A., Barrandeguy, M., Costantini, V., Craig, M. I., ... Fernández, F. (2004). Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100(1–2), 7–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.02.007>
- Reber, A. J., Hippen, A. R., & Hurley, D. J. (2005). Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures. *American Journal of Veterinary Research*, 66(11), 1854–1860. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1854>
- Roth, J. A., & Smith, R. A. (2004). Inmunología. *The Veterinary Clinics of North America*, 17.
- Salmon, H. (1999). The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(1–2), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00127-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00127-0)
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., Wheeler, T. T., Stelwagen, K., ... Wheeler, T. T. (2009). Immune components of bovine colostrum and milk 87 (13), 3-9. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1377>
- Tizard, I.R. *Veterinary Immunology Nine edition*. (Elsevier, Ed.) (9th ed.). St. Louis Missouri.
- Weaver, D. M., Tyler, J. W., VanMetre, D. C., Hostetler, D. E., & Barrington, G. M. (2000). Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves. *Journal of veterinary internal medicine*, 14(6), 569–577. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02278.x>
- Wheeler, T. T., Hodgkinson, A. J., Prosser, C. G., & Davis, S. R. (2007). Immune components of colostrum and milk - A historical perspective. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(4), 237–247. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9051-7>







Capítulo 3

Lactogénesis

O.F. Huertas-Molina^{1,2} MVZ, MSc; K. Vargas² MyB MSc;
M. Olivera-Angel² DMV, Dr. Sci.Agr.

1. Introducción

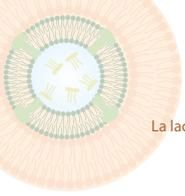
La lactogénesis es la habilidad de producir lactosa y consiste en un periodo de transición caracterizado por la diferenciación funcional de las células del tejido mamario, las cuales cambian de un estado no lactante (no secretorio) a lactante (secretorio) (McManaman & Neville, 2003; Truchet & Honvo-Houéto, 2017).

Este proceso se ha dividido en dos fases: 1) fase de activación secretoria o **lactogénesis I** donde, además de ocurrir diferenciación celular y

1. Agrosavia, San José del Nus, Antioquia, Colombia.

2. Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.





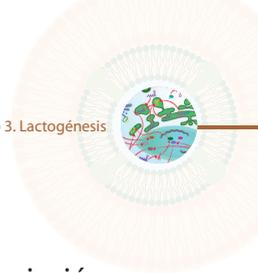
enzimática (Hurley, 2013; Neville, Neville, Mcfadden & Forsyth, 2002), se da la calostrogénesis (ver capítulo II. Calostrogenesis) y 2) fase de activación secretoria o **lactogénesis II**, caracterizada por la secreción copiosa de leche (Neville & Morton, 2001; Preusting, Brumley, Odibo, Spatz & Louis, 2017).

2. Lactogénesis I, preparando la maquinaria

En esta etapa, que es un periodo de transición, las CEM, llamadas también lactocitos, experimentan diferenciación enzimática y celular que las lleva a un estado presecretorio. En esta fase las organelas se polarizan, es decir, se trasladan hacia el tercio basal de las CEM. Durante la lactogénesis I también se produce el calostro, que está compuesto entre otros por fracciones de la leche y por inmunoglobulinas maternas (ver capítulo II. Calostrogénesis) (Anderson, Rudolph, McManaman & Neville, 2007; Hurley, 2010).

Pocos días antes del parto, el número y el tamaño de algunas organelas incrementa considerablemente (Tabla 1) y aparecen vesículas secretoras (VS) y gotas lipídicas que son liberadas posteriormente al lumen alveolar (Truchet & Honvo-Houéto, 2017).

La diferenciación y actividad de la CEM es determinada por las concentraciones de ADN y ARN. En el estado no secretorio, es decir, cuando la vaca está en periodo seco, la relación ARN/ADN es menor a 1 (los genes no se están transcribiendo). Después, cuando empieza la etapa de diferenciación, esta relación incrementa 2 a 1, pues la concentración de ARN mensajero (ARNm) aumenta debido a la transcripción de los genes implicados (Salama, 2005). Este ARNm se traduce en las proteínas que generan los cambios enzimáticos necesarios para la producción de leche. Por otro lado, las concentraciones de ADN son indicadores del nú-



mero de células y expresión de genes que promueven la diferenciación enzimática (Osorio, Lohakare & Bionaz, 2016).

Los cambios en esta etapa incluyen síntesis de Acetil-CoA carboxilasa, ácido graso sintetasa y otras enzimas asociadas con la lactogénesis. Además, hay un incremento en los sistemas de transporte de aminoácidos, glucosa, ácidos grasos, proteínas y otros sustratos necesarios para la síntesis de lactosa (Hurley, 2010; Wall & Mcfadden, 2012), así como de la α -lactoalbúmina, caseína y β -lactoglobulina (Bionaz, Hurley & Loor, 2012). Es decir, de todos componentes de lo que se llama la leche.

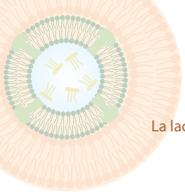
La alta concentración de potasio en la CEM hace que el sodio (Na^+) sanguíneo circulante se concentre en el fluido extracelular basal; sin embargo, la falta de sellamiento entre las CEM por las uniones estrechas hace que agua y Na^+ puedan pasar al lumen alveolar y la lactosa al fluido extracelular (Hurley, 2010; Neville & Morton, 2001; Rezaei, Wu, Hou, Bazer & Wu, 2016).

Tabla 1. Diferenciación celular durante la Lactogénesis I y II

Diferenciación secretoria	
Lactocito parto	Lactocito lactante
Núcleo grande, irregular y disperso	Núcleo mediano, redondeado ubicación basal
Retículo endoplásmico liso pequeño	Hipertrofia
Aparato de Golgi pequeño	Incremento de microvellosidades
Escasas microvellosidades	Aumento del número de mitocondrias
Escasas mitocondrias	Aumento de gotas lipídicas
Escasas gotas lipídicas	Numerosas vesículas secretorias
Escasas micelas de caseína	Aumento en las micelas de caseína

Fuente: Hurley, 2010.





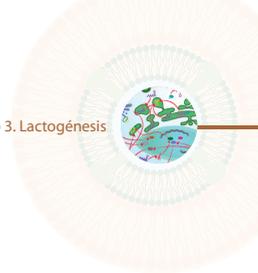
3. Lactogénesis II, secreción copiosa de leche

En la vaca, la secreción copiosa de leche comienza en los últimos cuatro días previos al parto y se extiende hasta dos o tres días después de este. Al inicio disminuye el nivel plasmático inhibitorio de la progesterona e incrementan las concentraciones sanguíneas de prolactina, glucocorticoides y estrógenos asociados al parto (Hurley, 2013, 2010). Al mismo tiempo se completa el cierre de las uniones estrechas entre los lactocitos, que incrementan la tensión de unión entre ellos, impidiendo el intercambio de solutos entre el lumen alveolar y la membrana basolateral (Nguyen, Parlow & Neville, 2001). Estas uniones estrechas impiden el paso de la lactosa desde el lumen alveolar hacia el espacio intercelular basal y de Na^+ hacia el lumen alveolar (Anderson et al., 2007). El aumento de fuerza de las uniones estrechas cuenta como el evento celular más relevante y marca el inicio de la etapa II de la lactogénesis.

4. Hormonas del complejo lactogénico

Los cambios hormonales son los inductores de la lactogénesis antes del parto. Las principales hormonas del complejo lactogénico son la progesterona, los corticoides y la prolactina (Capuco & Ellis, 2013; Macias & Hinck, 2013).

La concentración de progesterona alta durante la gestación induce la proliferación de los lactocitos y la preparación de la maquinaria celular (núcleo, ribosomas, retículo endoplásmico liso y rugoso, entre otros); sin embargo, estos niveles de progesterona mantienen una acción inhibitoria sobre la lactogénesis (Hurley, 2013; Neville & Morton, 2001). Al momento del parto, el incremento de los glucocorticoides, cortisol y corticosterona y el descenso de progesterona están asociados con el



incremento de disponibilidad de glucosa —precursor de la lactosa— en el tejido mamario (Wall & Mcfadden, 2012).

La prolactina incrementa significativamente dos o tres días antes del parto y directamente o por factores de transcripción participa activamente en el desarrollo mamario (Capuco & Ellis, 2013). Esta hormona es el mayor contribuyente de la regulación, porque induce la expresión de los receptores GLUT insulino-independientes de la glándula mamaria, así como la expresión de los genes de la α -lactoalbúmina (LALBA) y β -1,4-galactosil transferasa (B4GALT1) (Bionaz & Loor, 2011). La prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH) inducen en la CEM la producción del factor de crecimiento insulínico (IGF) - I, IGF-II, IGF-III, IGF-IV, IGF-V, IGF-VIII e IGF-XII, además inducen la expresión de receptores de insulina, de proteínas de unión a la IGF y de cotransportadores de sodio/glucosa (Ostrowska, Jarczak & Zwierzchowski, 2015).

5. Transporte de solutos y vías de secreción

La región basal de la CEM está en contacto con las células mioepiteliales y el espacio extracelular que separa el epitelio de los vasos sanguíneos y el estroma (Figura 1).

Las barreras que evitan el paso de sustancias exógenas desde el estroma o la sangre hasta la leche son: 1) las membranas del estroma (tejido adiposo y fibroblastos) y de la vasculatura, 2) el espacio extracelular, 3) la membrana basolateral (MPB) de la CEM, 4) las uniones estrechas y GAP, 5) la membrana del aparato de Golgi y 6) la membrana plasmática apical (MPA) del lactocito (McManaman & Neville, 2003) (Figura 1).

El paso de solutos hacia el lumen alveolar puede ocurrir mediante mecanismos de transporte transcelulares o de mecanismos paracelulares.



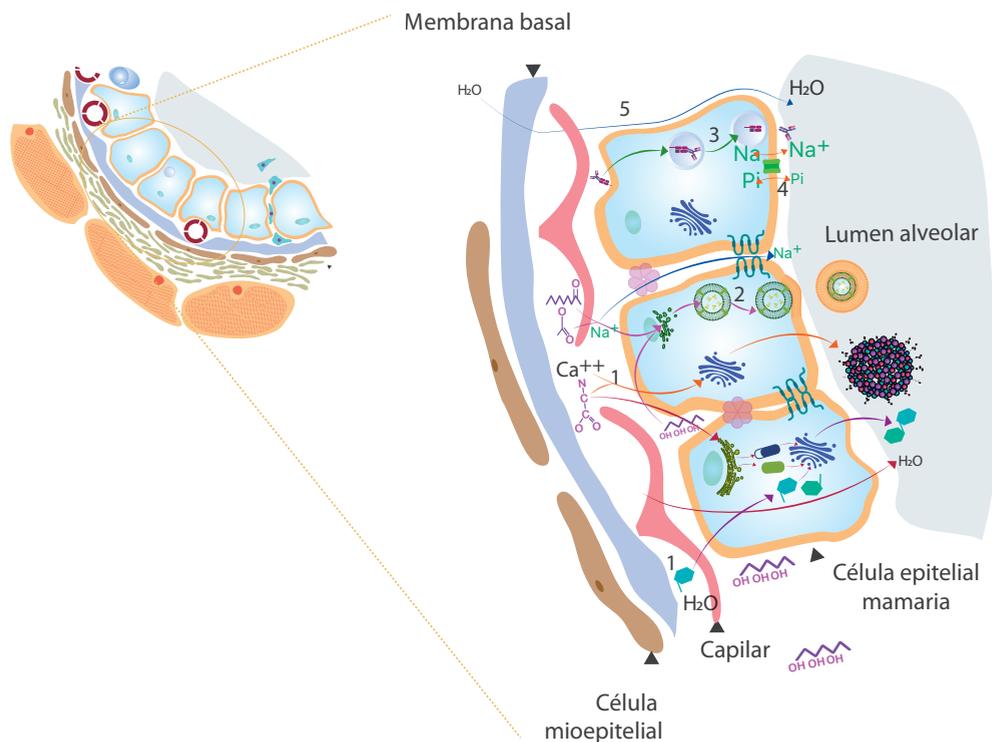


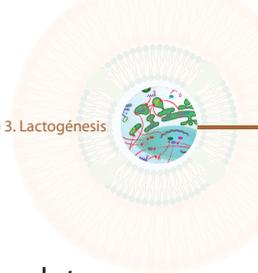
Figura 1. Barreras de internalización y paso de solutos

Paso de solutos hacia el lumen alveolar: **1)** vía exocítica por medio de vesículas secretorias, **2)** vía de secreción de lípidos, **3)** vías de transcitosis, **4)** transporte de iones y **5)** vía de secreción paracelular

Fuente: O.F Huertas--Molina, M. Olivera-Angel, K. Vargas, 2019

Convenciones

	Acetato		Aminoácido		Triglicérido
	Gap cerrada		Gap abierta		Caseína
	α Lactoalbumina		Glicerol		Inmunoglobulina
	Glucosa		Gota lipídica		Uniones estrechas
	LCFA		Galactosiltransferasa		FcRn
	Lactosa		Vesícula secretoria (VS)		Galactosa
	Macrogota lipídica		Aparato de Golgi		



Se han descrito 5 rutas de la vía de secreción y transporte de solutos (McManaman & Neville, 2003; Truchet & Honvo-Houéto, 2017), a saber:

Vía de secreción exocítica

Esta vía es el mecanismo primario de secreción de proteínas y lactosa (almacenadas o sintetizadas en el aparato de Golgi) desde el citosol hasta el lumen alveolar. Las proteínas y la lactosa salen de la organela envueltas en una VS que se desplaza a través del citosol hacia la membrana apical, donde se fusionan para liberar su contenido a la leche mediante exocitosis (McManaman & Neville, 2003; Osorio et al., 2016) (Figura 1).

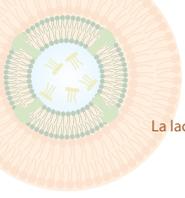
Vía de secreción de lípidos como glóbulos grasos de la leche

Un glóbulo graso de la leche es la condensación de triglicéridos envueltos en una bicapa lipídica del retículo endoplásmico liso (REL), que a su vez sale envuelta en la bicapa lipídica membranal del MPA. Esta vía se usa para la secreción de los lípidos de la leche, los cuales son sintetizados en el REL a partir de ácidos grasos, glicerol y cuerpos cetónicos para dar lugar a la formación de triglicéridos (98% de la grasa sintetizada) y fosfolípidos (2% de la grasa sintetizada). Los lípidos son liberados del REL en forma de gotas citoplásmicas lipídicas, las cuales se fusionan entre ellas dentro del citosol y luego son secretadas al lumen alveolar, envueltas en la bicapa lipídica membranal, como glóbulos grasos de la leche (Bionaz & Loor, 2008; McManaman & Neville, 2003; Truchet & Honvo-Houéto, 2017) (Figura 1).

Vía de transcitosis

Después de su endocitosis mediada por receptores en el lado basal de las CEM, algunas moléculas intersticiales ingresan al lumen de la célula;





las moléculas maduran en el endosoma y se transportan a la MPA solas o en complejo con su receptor, donde se secretan por exocitosis, mientras que su receptor se degrada o se recicla hasta llegar de nuevo a la MPB. La transcitosis se ha descrito para el transporte de la inmunoglobulina A, insulina, prolactina, albúmina sérica, transferrina, IGF-1 y lipoproteínas de baja densidad. Es de destacar que la fusión de algunos endosomas maduros con las VS puede ocurrir en el MPA antes de la exocitosis de su contenido (Boisgard, Chanut, Lavialle, Pauloin & Ollivier-Bousquet, 2001; Truchet & Honvo-Houéto, 2017; Truchet & Ollivier-Bousquet, 2009) (Figura 1).

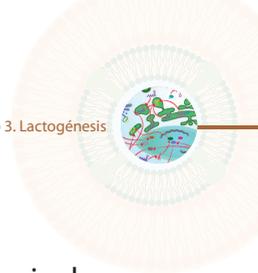
Vía de transporte de membrana

Bajo esta categoría se clasifican diferentes tipos de transporte (específicos de cada soluto), mecanismos de transporte de iones monovalentes y polivalentes y pequeñas moléculas como glucosa y aminoácidos. La transferencia de estas sustancias desde la sangre hacia la leche por esta vía requiere la presencia de transportadores específicos de la membrana basal y apical o de la membrana de Golgi y de la VS. El transporte del agua a través de la Acuaporina-3, ubicada en BPM y APM (McManaman & Neville, 2003; Truchet & Honvo-Houéto, 2017), también se hace por esta vía (Figura 1).

Vía de transporte paracelular

El transporte a través de la vía paracelular es directo y bidireccional, permite el paso de soluto de alto y bajo peso molecular entre el lumen alveolar y el espacio intersticial durante la preñez, involución o eventos de mastitis (Truchet & Honvo-Houéto, 2017).

Las CEM están unidas entre sí por uniones estrechas que antes y durante la etapa de lactogénesis I presentan “agujeros” que permiten difusión



de moléculas de pequeño tamaño en dos vías (Figura 1B). Las principales moléculas son sodio, potasio y lactosa (Hurley, 2010; McManaman & Neville, 2003). Antes de que se incremente la fuerza entre las uniones estrechas (lactogénesis II), la CEM, que tiene altas concentraciones internas de potasio, hace que el sodio sanguíneo circulante se concentre en el fluido extracelular del epitelio alveolar. Por otro lado, las concentraciones de sodio en el lumen alveolar son muy bajas, lo que hace que el elemento tienda a difundirse entre las CEM y, por lo tanto, incrementa su concentración en el lumen. Por lo anterior, en la etapa de lactogénesis I el Na^+ en leche es relativamente más alto (Hurley, 2010; Rezaei et al., 2016) (Figura 1).

El epitelio mamario secreta pocas cantidades de lactosa hacia el lumen alveolar, pero como las uniones son laxas, se encuentra lactosa tanto en lumen como en fluido extracelular. Finalmente, el aumento de fuerza entre las uniones estrechas de los lactocitos impide la interacción entre los componentes del lumen alveolar y el fluido extracelular, lo que hace que el número relativo de solutos incremente en el primero. Así, se marca definitivamente el inicio de la etapa II de la lactogénesis (Neville & Morton, 2001; Rezaei et al., 2016).

6. Elaboración y exocitosis de los tres grandes componentes de la leche

6.1 La lactosa

La lactosa se produce a partir de dos moléculas de glucosa. A continuación, se describe el mecanismo de producción y exocitosis (Figura 2).

Después de la absorción de glucosa por los receptores GLUT-1 en la membrana basolateral de la CEM, algunas de estas moléculas ingresan al aparato de Golgi a través de un GLUT-1, mientras que las otras deben



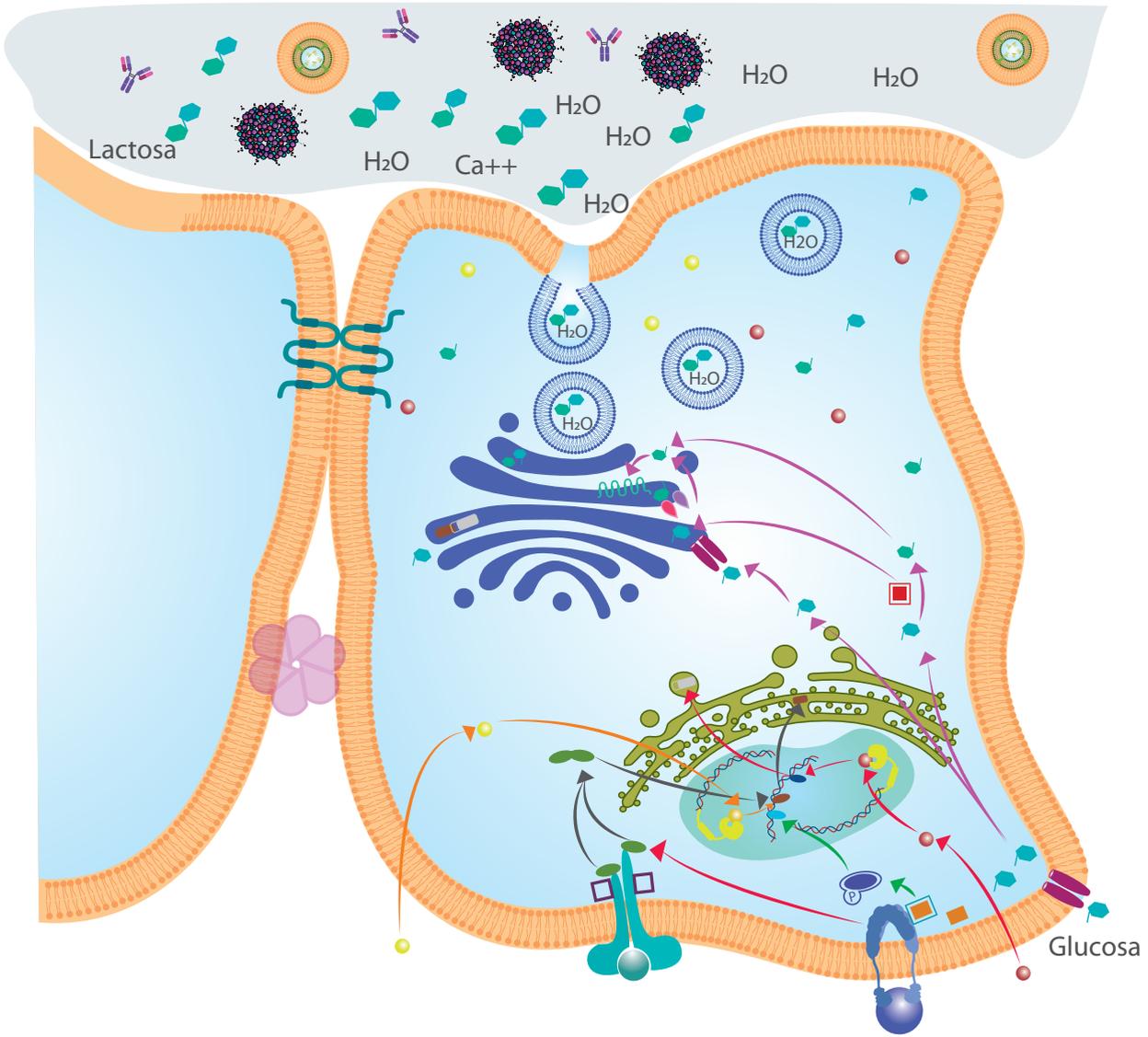
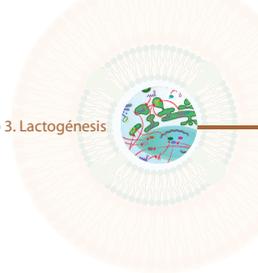


Figura 2. Vía de producción de la lactosa, desde el ingreso de la glucosa hasta la exocitosis de la lactosa

Fuente: O.F. Huertas-Molina, M. Olivera-Angel, K. Vargas, 2019



Convenciones

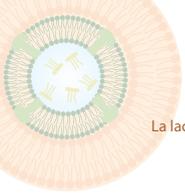
	Inmunoglobulina		Receptor insulina		Receptor prolactina
	Glucosa		Aparato de Golgi		Insulina
	α Lactoalbumina		Prolactina		Estradiol
	β Galactosiltransferasa		Cortisol		Glucosa G Fosfatasa
	Galactosa		Lactosa		SLC35A2
	Globulo graso		STAT5		PDK
	α Gen de α -LALBA		PBK		mTOR
	Gen GLUT		Receptor GLUT		UGP2
	β Gen de UGP2, Gen de B4GALT1		PGM1		Receptor nuclear para estradiol y cortisol

convertirse en galactosa. En este proceso la glucosa se fosforila a glucosa-6 fosfato y se une con uridina-di-fosfato (UDP) para formar UDP-glucosa, la que, a su vez es convertida a UDP-galactosa por las enzimas UDP-glucosa pirofosforilasa 2 (UGP2) y fosfoglucomutasa 1 (PGM1).

Esta última enzima permite el ingreso de UDP-galactosa al aparato de Golgi por medio del transportador 2 de UDP-galactosa (SLC35A2). El aparato de Golgi sintetiza la lactosa por la combinación de una molécula de UDP-galactosa y una de glucosa. Esta síntesis está inducida por el complejo lactosa sintasa, a su vez compuesta por B4GALT1 y LALBA (Bionaz et al., 2012; Osorio et al., 2016). LALBA otorga especificidad a B4GALT1 para que se una la glucosa con la UDP-galactosa.

La presión osmótica de la lactosa estimula el ingreso de agua al aparato de Golgi desde el citosol y es allí donde se forma la VS de doble membrana que contiene lactosa y agua. La VS sale al citoplasma y es dirigida al borde apical de la célula, donde se fusionan sus membranas con la



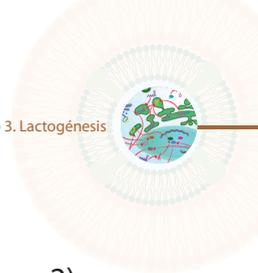


membrana celular. La lactosa queda entonces dentro, junto con varias moléculas de agua, y así es exocitada (Nickerson & Akers, 1984). La lactosa, a través de su efecto osmorregulador, hace que ingrese más agua al lumen de los alvéolos y, por consiguiente, le da volumen a la leche producida (Hurley, 2010).

La producción de lactosa está influenciada por las distintas hormonas del complejo lactogénico (insulina, prolactina, glucocorticoides y estrógenos), dependiendo de la etapa de gestación, momento del parto, frecuencia del ordeño e involución de la glándula mamaria (Bionaz et al., 2012; Osorio et al., 2016).

La expresión de los genes involucrados en la maquinaria de ensamble de lactosa depende de la prolactina y de la insulina que, unidos a su respectivo receptor, son los principales reguladores del transductor de señales y activador transcripcional de glucocorticoides 5 (STAT5). Este último inicia la traducción en la región promotora del gen de *LALBA* que codifica para la producción de LALBA (Bionaz et al., 2012; Xu, Ji, & Yan, 2012). También los glucocorticoides unidos a su receptor nuclear inducen la activación de este gen a través de una sinergia con STAT5. Los estrógenos regulan la expresión del gen que codifica la *B4GALT1* por una vía nuclear directa (Choi et al., 2012). La activación (Bionaz et al., 2012) de los genes *LALBA* y *B4GALT1* incrementa al inicio de la lactogénesis I (Osorio et al., 2016).

La captación de glucosa depende de la expresión de los receptores GLUT (Figura 2 y 3), la cual está mediada por la unión de la insulina a su receptor. Una vez activo este primer mensajero, se induce la fosforilación y activación del blanco de rapamicina de células de mamífero (mTOR). Luego, mTOR, por medio de la proteína quinasa D (PKD), activa los genes de captación de glucosa que son los que transcribirán para que se exprese su receptor. Para la producción de galactosa, el mTOR



activa el gen *UGP2* (Bionaz et al., 2012; Bionaz & Loor, 2008) (Figura 2).

Mientras no es requerido, mTOR es inhibido por el complejo de escleriosis tuberosa (TSC). Para desactivar esta acción inhibitoria, la insulina, unida a su receptor por medio de la vía proteína quinasa B (PKB), bloquea la TSC. mTOR también tiene la capacidad de autoregularse al bloquear la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Bionaz et al., 2012).

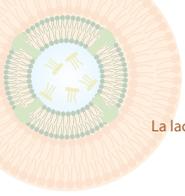
6.2 La proteína

Las principales proteínas de la leche son las caseínas (α -S1, α -s2, β y κ) (Figura 3) y las proteínas séricas (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina e inmunoglobulinas). También se encuentran muchas otras proteínas como osteopontina, relaxina, lactoferrina, transferrina, lisozima, lactoperoxidasa e inmunoglobulinas secretorias (IgA e IgM). Las membranas del glóbulo graso, también compuesta de proteínas, representan del 1 al 4% de las proteínas totales de la leche (Bionaz et al., 2012).

Las α -caseínas y β -caseínas se encuentran en formas multi-fosforiladas (s2, s3, s4, s5 y s6) y son sintetizadas en la CEM como repuesta a la acción de la prolactina (Dahanayaka, 2016). Por otro lado, la β --caseína, cuya función es estabilizar la micela (Rezaei et al., 2016) (Figura 3), es una glicoproteína que consiste en fragmentos C-terminales de la β -caseína. Dentro del alvéolo, por degradación proteolítica de la plasmina, la β -caseína se convierte en β -caseína.

La estructura, síntesis y secreción de caseína dependen directamente de la disponibilidad de aminoácidos y glucosa en la dieta (Osorio et al., 2016). Además, se necesitan las vías endocrinas de la prolactina, insulina y el cortisol que sirven como factores de expresión o activadores de factores de transcripción como mTOR y STAT5 (Bionaz & Loor, 2011; Groner, 2002; Sarbassov, Ali, & Sabatini, 2005).



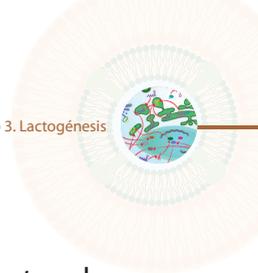


La insulina y la prolactina, unidos a sus receptores, regulan la síntesis de proteínas de manera indirecta a través de la activación de STAT5 por la vía JAK-2, que induce la expresión de la región ELF5, la cual contiene el gen de κ caseína (CSN3) y LALBA (Bionaz & Loor, 2008) (Figura 3). Adicionalmente, el cortisol, unido a su receptor nuclear, actúa como co-activador de STAT5 (Groner, 2002), lo que resulta en mayor expresión de la región ELF5 (Bionaz & Loor, 2011).

Al unirse la insulina con su receptor y sus dos subunidades —PDK y PKB— también se activa la vía de mTOR. mTOR es la principal mediadora de la biosíntesis de caseína por sus funciones como inductor de la traducción (Bionaz & Loor, 2011), pues fosforila la proteína de unión al factor eucariótico de iniciación de la traducción (4E-BP1). Esto a su vez permite que el factor eucariótico de iniciación de la traducción (EIF4E) forme un complejo con otros factores (Salama et al., 2019) y entonces se una a la subunidad 40S del ribosoma, dando lugar al complejo de pre-iniciación 43S, encargado de iniciar la traducción de mRNA mensajero en proteína (Bionaz et al., 2012).

Hay 3 mecanismos adicionales por medio de los cuales mTOR también contribuye a la biosíntesis proteica (Bionaz et al., 2012):

- (1) Incrementa la activación de subunidad 40S ribosomal a través de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 quinasa (S6K1), que al mismo tiempo fosforila a la proteína ribosomal s6 (RPS6).
- (2) Esta última proteína, además, funciona como regulador post-transcripcional para la elongación de las proteínas en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER), porque inhibe la quinasa del factor eucariótico de elongación (EEF2K), permitiendo el proceso de elongación proteico mediado por el factor eucariótico de elongación 2 (EEF2) activado.



- (3) El tercer mecanismo ocurre cuando mTOR actúa como factor de transcripción para la captación de glucosa y aminoácidos, mediada por la expresión de los genes (4F2hc, LAT1, ASCT2, GLUT1, GLUT3 y GLUT12) encargados de estos dos procesos (Bionaz et al., 2012; Zhao & Keating, 2010).

Se ha observado que mTOR es capaz de autoregularse mediante la captación de glucosa (Curtis et al., 2013; Liu, Zhao, & Liu, 2013). La glucosa produce ATP en la mitocondria por la vía del piruvato y así bloquea la AMPK y TSC inhibidores de la activación de mTOR (Bionaz et al., 2012; Sarbassov et al., 2005; Toerien, Trout & Cant, 2009).

La captación de aminoácidos también contribuye a la activación de mTOR cuando incrementa la expresión de sus transportadores o por medio de la vía fosfatidil inositol quinasa 3 (vps34) (Bionaz & Loor, 2008; Lei, 2012). La leucina (Rulquin & Pisulewski, 2006) y otros aminoácidos son capaces de intervenir directamente en el inicio de la traducción mediante la activación de la subunidad 40S del ribosoma o indirectamente mediante la fosforilación de la S6K1 (Kim & Wu, 2009; Rezaei et al., 2016; Rius et al., 2010).

Tanto las caseínas, la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina son entonces sintetizadas en el RER y transportadas al aparato de Golgi (Bionaz & Loor, 2011). Las caseínas se unen covalentemente tanto al fósforo como al calcio (Ca^{++}) que ingresa a la CEM por canales dependientes de ATP. Así, se ensamblan en miscelas y después se envuelven en VS para ser liberadas al citoplasma, donde se transportan por medio de microtúbulos hacia la zona apical de la CEM (Dahanayaka, 2016; Haenlein & Wendorff, 2006). La membrana apical y la VS se fusionan y generan una apertura a través de la cual su contenido es descargado al lumen del alvéolo (Rezaei et al., 2016).



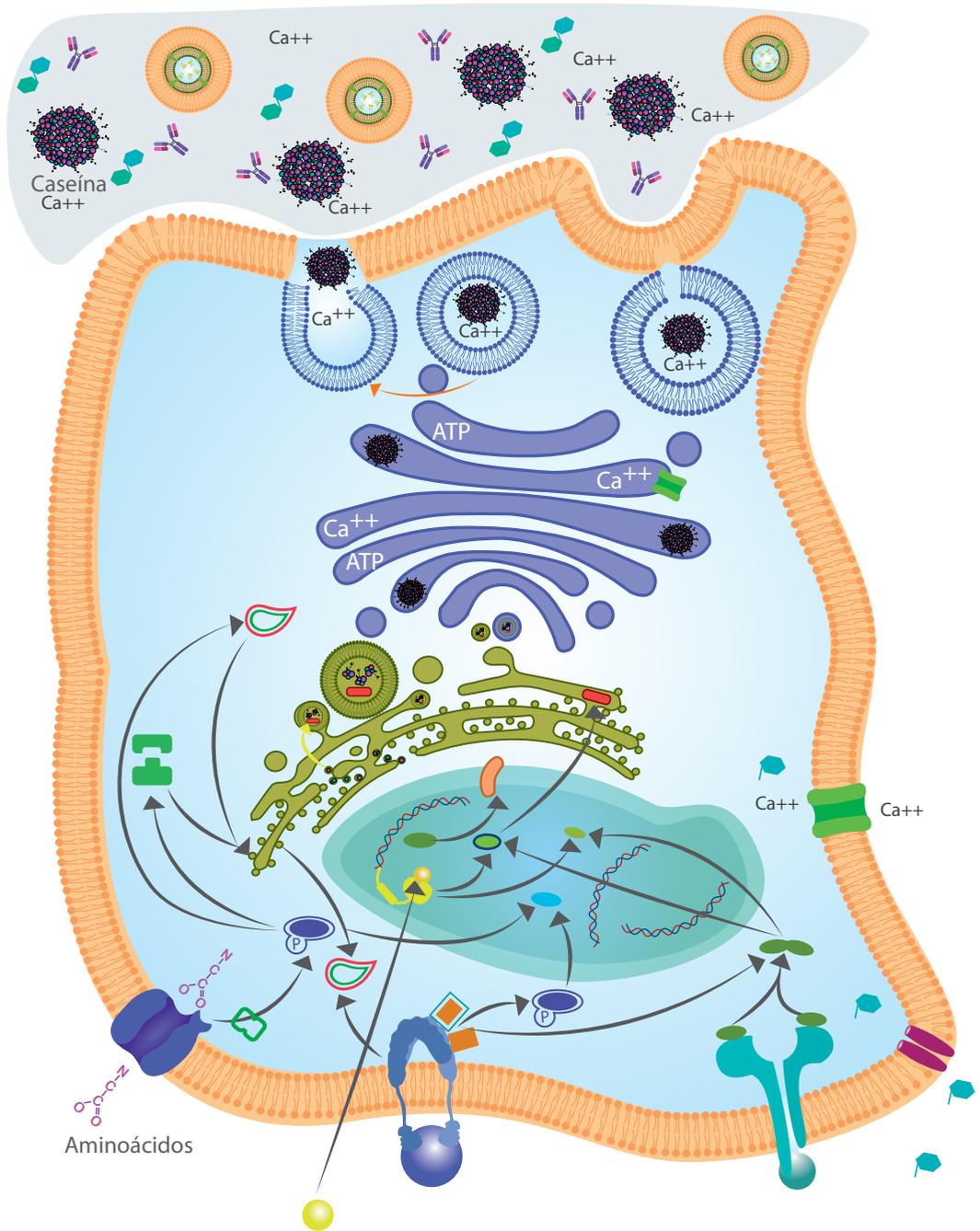
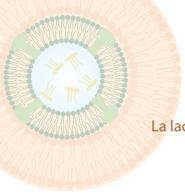


Figura 3. Vía de producción de las caseínas, desde el ingreso de los aminoácidos hasta la expulsión de la miscela de caseína

Fuente: F Huertas-Molina, M Olivera-Angel, K Vargas, 2019

Convenciones

	Aminoácido		PBK
	Aparato de Golgi		Prolactina
	ARN mensajero de CSN3 (K-Caseína)		Lactosa
	ARN mensajero de α -LALBA		Receptor Glut
	Cortisol		Receptor insulina
	CSN3		Receptor prolactina
	eIF4E		vp534
	4E-BP1		STAT 5
	Gen de α -LALBA		α_{s1} -Cn
	Gen GLUT		α_{s2} -Cn
	Glucosa		β -Cn
	Globulo graso		K-Cn
	Insulina		Submicela caseína
	Inmunoglobulina		Caseína
	Proteína ribosomal 56 Quinasa		Transportador de iones dependiente de ATP
	PDK		Receptor nuclear para estradiol y cortisol
	mTOR		



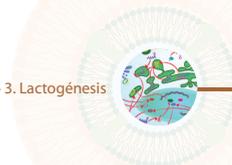
6.3 Los lípidos

Los lípidos secretados en la leche son sintetizados en el retículo endoplásmico liso (REL) a partir de ácidos grasos, glicerol y cuerpos cetónicos. Esto da lugar a la formación de triglicéridos (TAG) (98% de la grasa sintetizada) y fosfolípidos (2% de la grasa sintetizada), los cuales son liberados en forma de gotas citoplásmicas lipídicas que posteriormente se fusionan entre ellas dentro del citosol y salen al lumen alveolar como glóbulos grasos de la leche (Masedunskas, Chen, Stussman, Weigert & Mather, 2017).

Los ácidos grasos de cadena larga (LCFA), el acetato y los cuerpos cetónicos, principalmente β -hidroxibutirato (β HB), procedentes de la dieta y el metabolismo ruminal, son tomados de la circulación sanguínea e ingresan a la célula, los primeros por transporte activo y los demás por difusión simple (Bionaz, Osorio & Loor, 2015) (Figura 4).

La CEM obtiene ácidos grasos de tres fuentes: 1) los ácidos grasos de cadena corta y larga de los TAG provienen de lipoproteínas que circulan en la sangre y se obtienen de la dieta y el metabolismo ruminal; 2) los ácidos grasos no esterificados, transportados por la albúmina, provienen de la movilización de reservas corporales y 3) de la síntesis de novo en la CEM (Angulo, Mahecha & Olivera, 2009).

En los vasos sanguíneos se encuentran los receptores de lipoproteína de muy baja densidad (VLDLR) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que capturan el sustrato graso que conformarán los triglicéridos. Así llegan al fluido extracelular. Simultáneamente, la lipoproteína lipasa (LPL) actúa hidrolizando los TAG y se liberan al medio extracelular los LCFA (Bionaz & Loor, 2008; Osorio et al., 2016).



Una vez liberados en el medio extracelular, los LCFA son tomados y activados por acción coordinada entre el ácido graso translocasa (CD36) (Figura 4) y el acetil CoA sintetasa (ACSL-1). Los transportadores de ácidos grasos pueden ser SLC27A o la proteína de unión a los ácidos grasos 3 (FABP3) (Bionaz & Loor, 2008; Osorio et al., 2016). Los LCFA que entran a la célula (Figura 4) por transporte activo o por difusión pasiva (flip-flop) son activados por ACSL-1 por adición de un grupo CoA y unidos a FABP3, las cuales los transportan como ácidos grasos activados (AG-CoA) para procesos enzimáticos subsecuentes (Osorio et al., 2016).

La mayoría del acetato y parte del β HB circulante y provenientes de la fermentación en el rumen es usado como precursor de LCFA mediante la denominada *síntesis de novo* (Angulo et al., 2009). Esta tiene lugar en el citosol de la CEM y la llevan a cabo las enzimas Acil-CoA sintetasa (ACSS), Acetil-CoA sintasa de cadena media (ACSM), Acetil-CoA carboxilasa α (ACACA) y ácido graso sintasa (FASN). Los productos de la *síntesis de novo* (LCFA, MCFA y SCFA) son inmediatamente activados por un ACSL en la cara citoplásmica del REL (Bionaz & Loor, 2008; Osorio et al., 2016).

Parte de los LCFA activados son transportados por FABP3 hasta la cara citosólica del REL (Bionaz & Loor, 2008; Osorio et al., 2016), donde se unen con glicerol-6-fosfato. Este producto ingresa al lumen del REL y termina el ensamble del triacil glicerol (TAG) (Masedunskas et al., 2017) (Figura 3). La membrana del REL está constituida por ceramidas que vienen de los ácidos grasos inactivos provenientes de la *síntesis de novo* (Bionaz & Loor, 2011).

La adipofilina o perilipina (PLIN2) es la encargada de rodear los TAG en bicapa lipídica del REL para la formación de las gotas lipídicas citoplásmicas. Como resultado de la interacción entre la Xantina deshidrogenasa (XDH), el PLIN2 y la butirofilina (BTN1A1) se activa la exocitosis de la



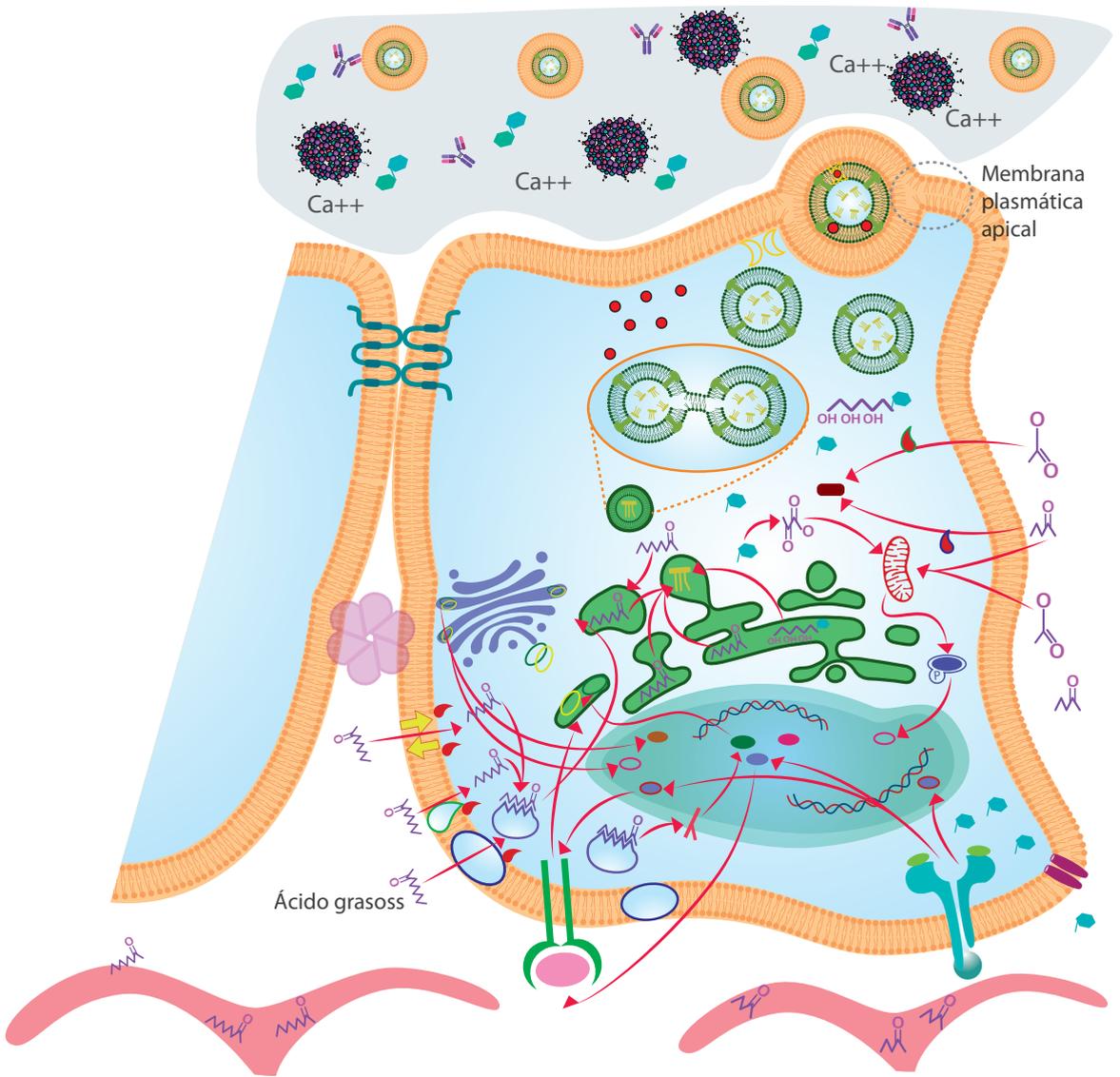
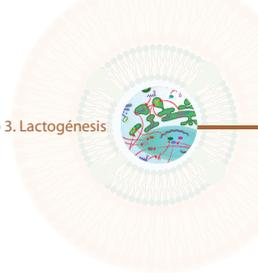


Figura 4. Vía de producción de lípidos: desde la absorción de los ácidos grasos hasta la secreción de las gotas lipídicas.

Fuente: F. Huertas-Molina, M. Olivera-Angel, K. Vargas, 2019

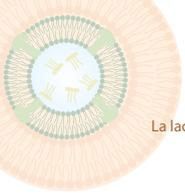


Convenciones

ACSL1	Gen receptor de leptina	XDH
ACSM	Gen de leptina	Pre separación Prolactina
ACSS	Gen de SREBP-1	PPARG
Acetato	Gen PPARG	Receptor Glut
Adipofilina	Glicerol	Receptor leptina
Aparato de Golgi	Globulo graso	Receptor prolactina
β Hidroxibutirato	Inmunoglobulina	Región RXR
Butirofilina	Lactosa	SRE
Caseína	Leptina	SREBP-1
CD36	Mitocondria	SCAP
Cortisol	Macrogota lipídica	STAT 5
Estradiol	mTOR	TAG
FABP3	PBK	Unión GAP
FABP3	PDK	Uniones estrechas
FASN	Piruvato	
Ácido graso de cadena larga (LCEA)	Flip - Flop	

gota hacia el lumen del alvéolo. Finalmente, la gota lipídica es rodeada por la MPA de la CEM que contiene además factores citosólicos (Bionaz & Loor, 2008; McManaman, 2014; Osorio et al., 2016; Truchet & Honvo-Houéto, 2017).





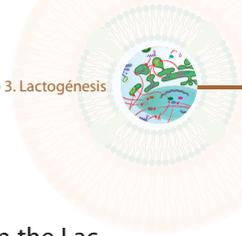
La expresión de los genes involucrados en el transporte de ácidos grasos (elemento de reacción al esteroles (*SRE*) y la región *RxR*) en la *síntesis de novo* (*SRE* y *región RxR*), en síntesis de triglicéridos (*región RxR*) y en la secreción de la gota lipídica (*región RxR*) está regulada por la influencia de la glucosa, la prolactina y la leptina y sus respectivos receptores, así como por ácidos grasos de cadena larga (Bionaz & Loor, 2008; Kadegowda, Bionaz, Piperova, Erdman & Loor, 2009; Osorio et al., 2016).

Por otro lado, la proteína de unión al elemento de reacción al esteroles-1 (*SREBP-1*) yace en su forma inactiva en la membrana externa del REL hasta que la activación del gen *SREBF-1* permite el clivaje de la proteína a través de la proteína de activación y clivaje (*SCAP*). Posteriormente, es transportada en *VS* hasta el aparato de Golgi, donde se activa e induce la función del *SRE* y la *región RXR* (Angulo et al., 2009; Li et al., 2014).

La actividad de *SREBP1* también está bajo el control de *mTOR*: la regula indirectamente impidiendo la entrada nuclear de *Lipina 1*, la cual bloquea su actividad mediante mecanismos no descritos. Los transportadores de glucosa (*GLUT 1*) están directamente relacionados con la fosforilación de *mTOR* a partir de la producción mitocondrial de *ATP*, una vez está disponible la glucosa en el espacio extracelular basal (Peterson et al., 2011).

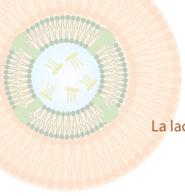
Bibliografía

- Anderson, S. M., Rudolph, M. C., McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2007). Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: It's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Research*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/bcr1653>
- Angulo, J., Mahecha, L., & Olivera, M. (2009). Síntesis, composición y modificación de la grasa de la leche bovina: Un nutriente valioso para la salud humana. *Revista MVZ Cordoba*, 14(3), 1856–1866.

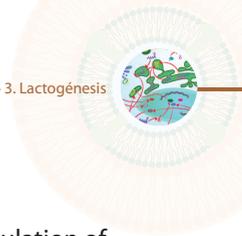


- Bionaz, M., Hurley, W., & Loor, J. (2012). Milk Proetin. Milk Protein Synthesis in the Lactating Mammary Gland : *Insights from Transcriptomics Analyses* (InTech). <http://dx.doi.org/10.5772/46054>
- Bionaz, M., & Loor, J. (2008). Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, 9, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-366>
- Bionaz, M., & Loor, J. (2011). Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinformatics and Biology Insights*, 5, 83–98. <https://doi.org/10.4137/BBI.S7003>
- Bionaz, M., Osorio, J., & Loor, J. (2015). Nutrigenomics in dairy cows: Nutrients , transcription factors , and techniques *American Society of Animal Science*, 93(12), 5531–5553. <https://doi.org/10.2527/jas2015-9192>
- Boisgard, R., Chanat, E., Lavialle, F., Pauloin, A., & Ollivier-Bousquet, M. (2001). Roads taken by milk proteins in mammary epithelial cells. *Livestock Production Science*, 70(1), 49–61. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00197-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00197-X)
- Capuco, A. V., & Ellis, S. E. (2013). Comparative aspects of mammary gland development and homeostasis. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1(1), 179–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103632>
- Choi, H. J., Chung, T. W., Kim, C. H., Jeong, H. S., Joo, M., Youn, B. H., & Ha, K. T. (2012). Estrogen induced β -1,4-galactosyltransferase 1 expression regulates proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426(4), 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.140>
- Curtis, R. V., Kim, J. J. M., Bajramaj, D. L., Doelman, J., Osborne, V. R., & Cant, J. P. (2013). Decline in mammary translational capacity during intravenous glucose infusion into lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 430–438. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7252>
- Dahanayaka, S. A. (2016). Isolation and characterization of porcine mammary epithelial cells from non-lactating and non-pregnant gilt. *Journal of Animal Science*, 93(11), 5186–5193. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9250>
- Groner, B. (2002). Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1–2), 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(02\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00142-X)
- Haenlein, G. F. W., & Wendorff, W. L. (2006). Sheep Milk. In Blackwell (Ed.), *Handbook of milk of Non-bovine mammals* (2nd ed., pp. 137–194).



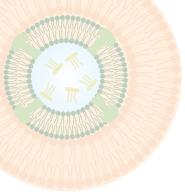


- Hurley, W. . L. (2013). Proceedings of the london swine conference. In *Lactation in motion* (pp. 25–28). London.
- Kadegowda, A. K. G., Bionaz, M., Piperova, L. S., Erdman, R. A., & Loor, J. J. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *Journal of Dairy Science*, *92*(9), 4276–4289. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1932>
- Kim, S. W., & Wu, G. (2009). Regulatory role for amino acids in mammary gland growth and milk synthesis. *Amino Acids*, *37*(1), 89–95. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0151-5>
- Lei, J. (2012). Nutritional and regulatory role of branched-chain amino acids in lactation. *Frontiers in Bioscience*, *17*(7), 2725. <https://doi.org/10.2741/4082>
- Li, N., Zhao, F., Wei, C., Liang, M., Zhang, N., Wang, C., ... Gao, X. J. (2014). Function of SREBP1 in the milk fat synthesis of dairy cow mammary epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(9), 16998–17013. <https://doi.org/10.3390/ijms150916998>
- Liu, H., Zhao, K., & Liu, J. (2013). Effects of glucose availability on expression of the key genes involved in synthesis of milk fat, lactose and glucose metabolism in bovine mammary epithelial cells. *PLoS ONE*, *8*(6), 6–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066092>
- Macias, H., & Hinck, L. (2013). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, *1*(4), 533–557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>.
- Masedunskas, A., Chen, Y., Stussman, R., Weigert, R., & Mather, I. H. (2017). Kinetics of milk lipid droplet transport, growth, and secretion revealed by intravital imaging: lipid droplet release is intermittently stimulated by oxytocin. *Molecular Biology of the Cell*, *28*(7), 935–946. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-11-0776>
- McManaman, J. L. (2014). Lipid transport in the lactating mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *19*(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/s10911-014-9318-8>
- McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2003). Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*(5), 629–641. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(03\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00033-4)
- Neville, M. C., & Morton, J. (2001). Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. *Pediatric Clinics of North America*, *48*, 35–52. DOI: 10.1093/jn/131.11.30055

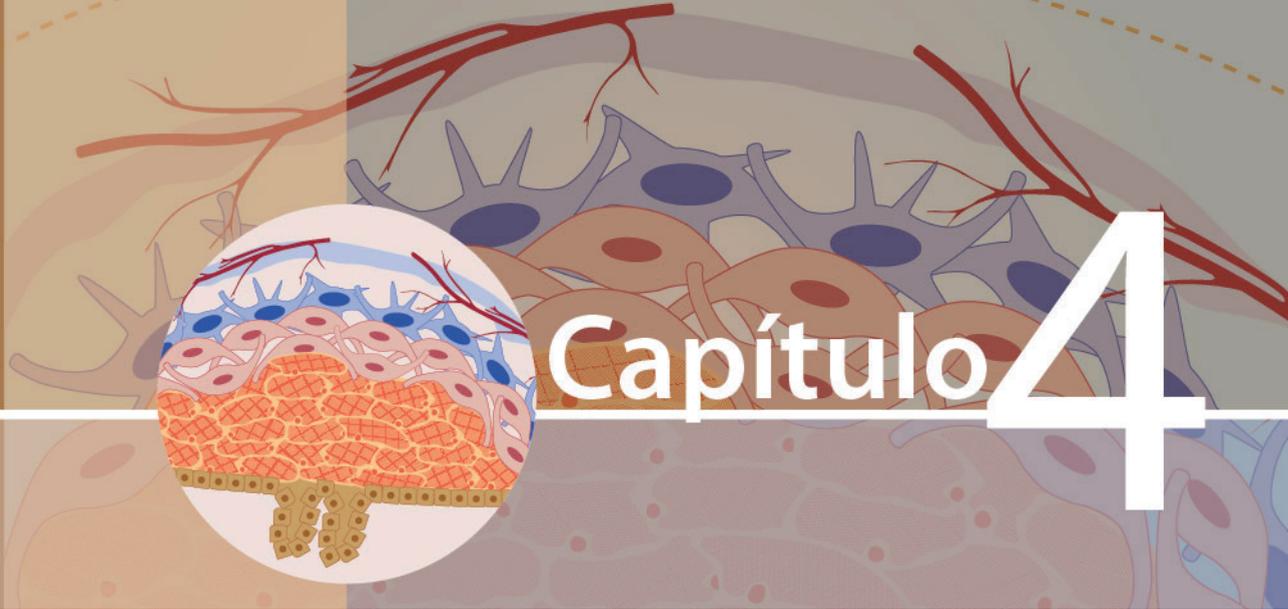


- Neville, M. C., Neville, M. C., Mcfadden, T. B., & Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(1), 49–66. <https://doi.org/10.1023/A>
- Nguyen, D. A., Parlow, A. F., & Neville, M. C. (2001). Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *Journal of Endocrinology*, 170(2), 347–356. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1700347>
- Nickerson, S. C., & Akers, R. M. (1984). Biochemical and ultrastructural aspects of milk synthesis and secretion. *Int. J. Biochem*, 16(8), 855–865.
- Osorio, J. S., Lohakare, J., & Bionaz, M. (2016). Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiological Genomics*, 48(4), 231–256. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00016.2015>
- Ostrowska, M., Jarczak, J., & Zwierzchowski, L. (2015). Glucose transporters in cattle - A review. *Animal Science Papers and Reports*, 33(3), 191–212.
- Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., ... Sabatini, D. M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146(3), 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>
- Preusting, I., Brumley, J., Odibo, L., Spatz, D. L., & Louis, J. M. (2017). Obesity as a predictor of delayed lactogenesis ii. *Journal of Human Lactation*, 33(4), 684–691. <https://doi.org/10.1177/0890334417727716>
- Rezaei, R., Wu, Z., Hou, Y., Bazer, F. W., & Wu, G. (2016). Amino acids and mammary gland development: Nutritional implications for milk production and neonatal growth. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0078-8>
- Rius, A. G., Appuhamy, J. A. D. R. N., Cyriac, J., Kirovski, D., Becvar, O., Escobar, J., ... Hani-gan, M. D. (2010). Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 3114–3127. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2743>
- Rulquin, H., & Pisulewski, P. M. (2006). Effects of graded levels of duodenal infusions of leucine on mammary uptake and output in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 73(3), 328–339. <https://doi.org/10.1017/s0022029906001841>
- Salama, A. (2005). Modifying the lactation curve in dairy goats: effects of milking frequency, dry period and kidding interval. UAB (Ed.).





- Salama, A. A. K., Duque, M., Wang, L., Shahzad, K., Olivera, M., & Loor, J. J. (2019). Enhanced supply of methionine or arginine alters mechanistic target of rapamycin signaling proteins, messenger RNA, and microRNA abundance in heat-stressed bovine mammary epithelial cells in vitro. *Journal of Dairy Science*, *102*(3), 2469–2480. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15219>
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, *17*(6), 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.009>
- Toerien, C. A., Trout, D. R., & Cant, J. P. (2009). Nutritional stimulation of milk protein yield of cows is associated with changes in phosphorylation of mammary eukaryotic initiation factor 2 and ribosomal s6 kinase 1. *The Journal of Nutrition*, *140*(2), 285–292. <https://doi.org/10.3945/jn.109.114033>
- Truchet, S., & Honvo-Houéto, E. (2017). Physiology of milk secretion. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, *31*(4), 367–384. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>
- Truchet, S., & Ollivier-Bousquet, M. (2009). Mammary gland secretion: hormonal coordination of endocytosis and exocytosis. *Animal*, *3*(12), 1733–1742. <https://doi.org/10.1017/s1751731109990589>
- Wall, E., & Mcfadden, T. (2012). Regulation of mammary development as it relates to changes in milk production efficiency. In Narongsak Chaiyabutr (Ed.), *Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health* (pp. 257–288). InTech.
- Xu, J., Ji, J., & Yan, X. H. (2012). Cross-Talk between AMPK and mTOR in Regulating Energy Balance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(5), 373–381. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500245>
- Zhao, F.-Q., & Keating, A. F. (2010). Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, *90*(July 2006), E76–E86. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-470>



Capítulo 4

Galactopoyesis y Galactoquinesis

Daniela Londoño¹, MV, Esp., MSc

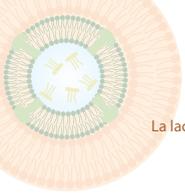
1. Introducción

La galactopoyesis es la etapa de la lactancia que inicia tras la terminación de la lactogénesis II y culmina con la involución de la glándula mamaria. Este proceso también es conocido como el mantenimiento de la lactancia o el mantenimiento de la producción de leche. La galactopoyesis involucra un conjunto regulado de cambios en cuanto al volumen y composición de la leche e incorpora dos elementos constitutivos importantes: las caseínas y las lactoglobulinas (Buhimschi, 2004).

La galactopoyesis se caracteriza por: primero, la **tasa de síntesis y secreción** por medio de factores endocrinos, paracrinós y autocrinos por

1. Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia.





la continua secreción de hormonas galactopoyéticas, y segundo, la **eyección de leche**. El vaciamiento de la glándula mamaria a través del ordeño o de la succión del pezón es indispensable para que la secreción láctea se mantenga (Akers, 2016; Valdés & Pérez, 1994).

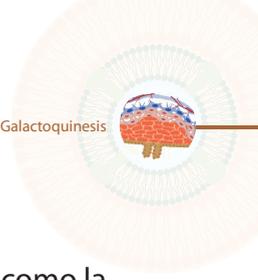
En la regulación endocrina de la secreción de leche se requiere tanto la integración como la interacción entre la adenohipófisis y las hormonas galactopoyéticas (Akers, 2016) como son la prolactina, la hormona del crecimiento (GH), el lactógeno placentario, los glucocorticoides, las hormonas tiroideas, los esteroides ováricos, la insulina y la oxitocina (Akers, 2017; Buhimschi, 2004; Truchet & Honvo-Houéto, 2017).

2. Las hormonas

Prolactina

La prolactina es una hormona proteica, con funciones en la mamogénesis, lactogénesis y galactopoyesis. La prolactina es una estructura constituida por 199 aminoácidos con un peso molecular de 23 kd con varias isoformas (Buhimschi, 2004; Chilton & Hewetson, 2005; Marasco, 2015; Saleem, Martin & Coates, 2018). Es una hormona monogénica (sintetizada a partir de un solo gen lactogénico) producida y liberada por las células lactotrofas de la adenohipófisis, las cuales sufren hiperplasia e hipertrofia durante la lactancia (Lacasse et al., 2012; Lacasse, Ollier, Lollivier & Boutinaud, 2015). Tras su síntesis, la prolactina se almacena en gránulos secretores citoplasmáticos hasta su liberación al sistema circulatorio y posterior unión a los receptores en la membrana del lactocito (Buhimschi, 2004).

Una de las funciones de la prolactina es desencadenar la acción enzimática para la producción de las caseínas de la leche, la lactosa sintasa

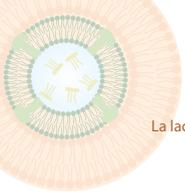


y enzimas involucradas en el metabolismo lipídico del lactocito como la expresión de la acetil- CoA carboxilasa. También se han encontrado funciones de la prolactina estimulando la bomba ATPasa Na/K en la CEM.

Otra de las funciones de la prolactina es modular el estado de diferenciación, supervivencia y proliferación (Chilton & Hewetson, 2005) de las CEM (McManaman & Neville, 2003; Tucker, 2010). Además, la prolactina protege a las células epiteliales mamarias de la apoptosis por supresión de la expresión de un inhibidor del factor similar a la insulina (IGFBP-5). La expresión del IGFBP-5 está relacionado con la disminución de la prolactina, que genera un aumento de la apoptosis de las CEM con una interrupción de la barrera sangre-leche y la disminución de la cantidad de las células secretoras (Akers, 2016). Otro efecto galactopoyético que tiene la prolactina en conjunto con la GH en el rumiante es mantener el número de CEM y su estado diferenciado (Lacasse et al., 2012).

La secreción de prolactina durante la galactopoyesis está relacionada con los estímulos asociados al ordeño o a la succión que inducen el reflejo de bajada de la leche. Las principales reguladoras a la baja de la prolactina son la dopamina y el sistema GABA (Akers, 2016), también llamados PIF (factores inhibidores de la prolactina), las cuales se producen en el hipotálamo. Allí también producen la β endorfina y la serotonina, llamadas también PRF (factores liberadores de la prolactina). Cuando inicia el estímulo de succión del pezón por parte del ternero o con el ordeño, se desencadena la galactoquinesis (reflejo de bajada y eyección de la leche) y se liberan serotoninas y β endorfinas, factores inhibidores de las dopaminas. También influyen en la liberación de la prolactina factores autocrinos y paracrinos como la tirotrina, el péptido vascular intestinal y la angiotensina II (Buhimschi, 2004; Perez, 2010; Saleem et al., 2018), así como la oxitocina, los opioides y la histamina.



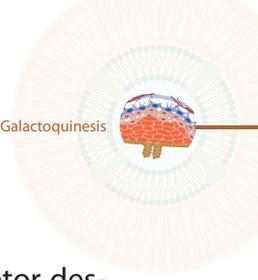


El reflejo de bajada y eyección de la leche determina la cantidad de prolactina secretada (Lacasse et al., 2012; Perez, 2010; Valdés & Pérez, 1994). Inicialmente se libera el PRF, una vez termina el reflejo se libera el PIF (Valdés & Pérez, 1994). Los niveles séricos máximos de prolactina se alcanzan de 15 a 20 minutos después de iniciado el ordeño y descienden de 10 a 15 veces después de este. Durante la galactopoyesis los niveles más altos de esta hormona se detectan hacia la semana 8 de lactancia (Akers, 2017; Lacasse et al., 2015). Se ha demostrado que los picos de prolactina producidos durante la galactopoyesis son más altos en las vacas multíparas que las vacas primíparas de razas productoras de leche (Collier, Annen-Dawson & Pezeshki, 2012).

Los estrógenos son los principales moduladores de la transcripción del gen de la prolactina (Buhimschi, 2004; Frasor & Gibori, 2003). Esta transcripción está regulada principalmente por el factor de transcripción específico de la hipófisis anterior (Pit-1), que regula también la transcripción del gen de la GH. La activación del gen por estímulo de los estrógenos requiere una interacción de Pit-1 con la hormona liberadora de tirotrópina y otros factores de crecimiento (Buhimschi, 2004; Frasor & Gibori, 2003).

La progesterona, por su parte, estimula en forma indirecta la liberación de prolactina por su efecto estimulador de la reducción de dopamina hipotalámica. La insulina, el cortisol y la GH contribuyen al efecto lactogénico de la prolactina, es decir, soportan la síntesis y secreción de la leche (Buhimschi, 2004; Lacasse et al., 2012).

Los efectos de la prolactina, tanto autocrinos como paracrinos, están mediados por el receptor de prolactina (PRLR) (Binart et al., 2002), uno de los miembros de la superfamilia de citoquinas hematopoyéticas (Shemanko, 2008). La expresión de los receptores aumenta a medida que avanzan las diferentes fases de la lactogénesis y aumenta aún más



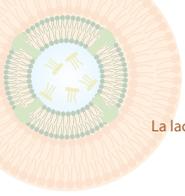
durante la galactopoyesis. La unión de la prolactina a su receptor desencadena la dimerización de este último, lo que conlleva a la activación de la vía JAK-2. Esta vía activa a las proteínas STAT que, una vez fosforiladas y dimerizadas, se traslocan al núcleo donde se unen al ADN de una manera específica para activar la transcripción de genes. JAK – STAT es la vía de señalización mejor caracterizada para la acción de la prolactina (Chilton & Hewetson, 2005) (Frasor & Gibori, 2003). La prolactina actúa a través de la STAT5a como regulador de la transcripción de caseína (Akers, 2016; Chilton & Hewetson, 2005; Perez, 2010)

Hormona del crecimiento (GH)

La hormona de crecimiento (GH), también conocida como somatotropina (ST), es considerada un agente homeorrético. Es una proteína galactopoyética (Tucker, 2010) conformada por 190 o 191 aminoácidos, sintetizada y secretada por la adenohipófisis (Etherton & Bauman, 1998). La secreción de esta hormona está regulada por dos péptidos hipotalámicos (Bergan-Roller & Sheridan, 2018): uno encargado de estimular, llamado factor liberador de la hormona de crecimiento (GRF), y otro de inhibir, llamado somatostatina (Etherton & Bauman, 1998). Los GRF varían entre las diferentes especies, los más conocidos son adenilato ciclasa (AC), adenosín monofosfato cíclico (AMPc), proteína quinasa A (PKA) y fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). Existen también mitógenos (MAPK) que además de estimular la liberación de GH, activan factores de transcripción como el PIT-1 y la proteína de unión en respuesta al AMPc (CREB), que a su vez induce la expresión de GH. La somatostatina inhibe la AC, lo cual impide la secreción de GH sin afectar su expresión (Bergan-Roller & Sheridan, 2018).

La GH inicia su acción al unirse a su receptor (GHR) localizado en la membrana plasmática de las células diana. Los GHR pertenecen a la familia de





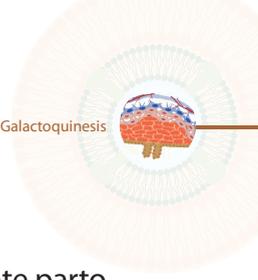
los receptores de citoquinas clase I. Estos receptores tienen 3 dominios: el extracelular, el transmembranal y el intracelular. La unión del GH a su receptor induce vías de señalización como JAK-STAT, PI3K-AKT, ERK y señales hormonales como la insulina y el IGF (Bergan-Roller & Sheridan, 2018).

Esta hormona actúa en el hígado estimulando la síntesis y secreción del factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1) y la proteína de unión al mismo (IGFBP) (Etherton & Bauman, 1998). El IGF-1 se une a sus receptores hipofisarios, estimula la liberación de somatostatina y por esta vía disminuye la producción y secreción de GH. La GH estimula además las hormonas tiroideas (Bergan-Roller & Sheridan, 2018) y aumenta la efectividad de otras hormonas lactogénicas y galactopoyéticas (Akers, 2016).

La GH genera dos tipos de efectos biológicos: el somatogénico, que estimula la proliferación celular mediado por el IGF-1, y el metabólico, que involucra el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales, lo cual produce cambios coordinados en el aprovechamiento de los nutrientes (Etherton & Bauman, 1998).

La vaca en el periparto pasa de no tener requerimientos para la producción de leche, ya que se encuentra seca, a requerir gran cantidad de nutrientes para la lactogénesis y galactopoyesis durante los primeros 100 días de lactancia. La GH es la hormona que induce la llamada **partición de nutrientes**, que se refiere a la resistencia del hígado a producir GHR. Como la GH no puede unirse a su receptor, no puede inducir la producción de IGF-1 ni de su proteína transportadora. Así que no se puede regular a la baja la GH, lo que induce hiperglicemia y lipólisis.

Para suplir las entre concentraciones de glucosa, triglicéridos y aminoácidos necesarios en la leche, la glándula mamaria toma los nutrientes requeridos a partir de la hiperglicemia y la lipólisis sistémica. La partición de



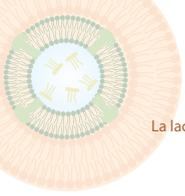
nutrientes se mantiene mientras la vaca, que ha ingresado durante parto en un déficit energético, es capaz de regresar a una condición de balance energético positivo, más o menos 100 días postparto. A medida que ingresa en un balance energético positivo, se expresan cada vez más GHR en el hígado, lo que hace que disminuya la hiperglicemia y la lipólisis.

Los principales órganos donde ocurre la homeorresis son el tejido adiposo y hepático. En el tejido adiposo, la GH inhibe la lipogénesis cuando los animales tienen un balance energético positivo y promueve la lipólisis cuando se encuentran en balance energético negativo (Akers, 2016). Estos cambios son mediados por una modulación de la capacidad de respuesta del tejido adiposo a la insulina, lo que permite el direccionamiento de la glucosa para apoyar el aumento de la producción de proteínas y azúcares para la síntesis de leche en animales lactantes (Ether-ton & Bauman, 1998). En el hígado, la GH interviene en el metabolismo de los carbohidratos, proceso fundamental en la vaca lechera ya que la glucosa se origina casi exclusivamente a partir de la gluconeogénesis en el hígado. Típicamente entre el 60 y el 80% de la glucosa se utiliza para la síntesis de leche. La GH permite mantener una tasa constante de gluconeogénesis (Ether-ton & Bauman, 1998).

En otros tejidos, como el músculo esquelético, los efectos galactopoyéticos son mediados por otros miembros del eje de la ST como el IGF-1 e IGFBP. La GH disminuye la utilización de glucosa y la oxidación de aminoácidos con el fin de conservar nutrientes y energía para la síntesis de lactosa, proteínas y lípidos de la leche. La GH no actúa directamente en la glándula mamaria, los IGF y las proteínas de unión son los mediadores de los efectos de la GH (Akers, 2016).

Hace varias décadas se comenzó a producir GH recombinante en cepas de *Escherichia coli* a partir de la incorporación de la secuencia de ADN que

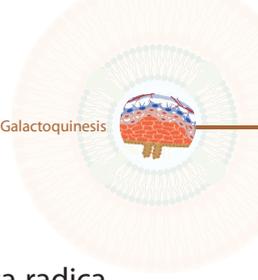




codifica para GH bovina. Con la producción de la somatotropina bovina (bST) se hizo factible utilizar la hormona para aumentar el rendimiento lactacional de las vacas lecheras (Akers, 2016). Se ha demostrado que la administración exógena de bST interviene en la producción y movilización de nutrientes para la producción de leche (Akers, 2017), lo cual mejora el rendimiento de la lactancia en mamíferos. En vacas se aplica principalmente en el último 80% de la lactancia, cuando están en balance energético positivo (la respuesta al inicio de la lactancia es insignificante). El resultado es un aumento de en promedio 4 a 6 Kg de leche/día (aproximadamente entre un 10 y un 15%) sin alterar la composición bruta de la leche (grasa, proteína y lactosa). La respuesta es indistinta a la raza lechera con la cual se trabaje, así como al número de partos y al potencial genético. La aplicación exógena de bST resulta en un mayor rendimiento y una mayor persistencia durante la lactancia, debido a una desviación del gasto cardiaco y a un aumento del flujo sanguíneo a la glándula mamaria (Etherton & Bauman, 1998). En respuesta a la aplicación de bST, la secreción de leche aumenta en un día y se maximiza en una semana. Este aumento se mantiene durante el tratamiento, pero vuelve rápidamente a los niveles de control cuando se suspende la aplicación de bST (Akers, 2016).

Oxitocina

El movimiento anterógrado de la leche a través de los alvéolos y los senos lactíferos no ocurre de forma pasiva y requiere la estimulación de agentes galactoquinéticos para su expulsión (Buhimschi, 2004). Las responsables de la contracción y expulsión de la leche son las células mioepiteliales que se encuentran rodeando los alvéolos y conductos mamarios (McManaman & Neville, 2003). Estas células carecen de inervación y contienen receptores para oxitocina que aumentan a los pocos días después del parto (Bruckmaier, 2005; Valdés & Pérez, 1994).



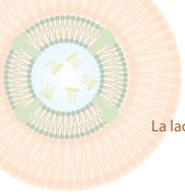
La importancia de la oxitocina como hormona galactoquinética radica en la eliminación eficiente de la leche acumulada en el alvéolo (Akers, 2016; Buhimschi, 2004). Al inicio del ordeño o amamantamiento, la leche se encuentra almacenada en los conductos galactóforos (leche cisternal) y puede ser removida por presión simple del pezón. La otra fracción de la leche se encuentra en los alvéolos y pequeños conductos (leche alveolar) (Angulo, 2007). La oxitocina viaja hasta la glándula mamaria a través del torrente sanguíneo, donde produce contracción de las células mioepiteliales por unión con su receptor. Este proceso tiene como consecuencia el desplazamiento de la leche desde el alvéolo hasta el espacio cisternal (Bruckmaier, 2005; Buhimschi, 2004).

Las vacas lecheras en producción pueden almacenar hasta 10 litros de leche cisternal en cada pezón. Los estímulos neurohormonales resultantes de la succión o palpación del pezón son transmitidos por nervios somáticos hasta el hipotálamo, lo que genera un estímulo en la neurohipófisis con la consecuente liberación pulsátil de oxitocina y en menor medida de vasopresina (Bruckmaier & Blum, 2010).

Si bien la oxitocina se libera desde la hipófisis de manera pulsátil durante la succión o el ordeño, la respuesta sobre el tejido mamario no está relacionada con la cantidad de leche en la ubre, sino exclusivamente con la eyección (Bruckmaier & Blum, 2010). Adicionalmente, algunos estímulos visuales u olfatorios se convierten en reflejos condicionados y pueden desencadenar la liberación de oxitocina. La galactoquinesis puede ser inhibida por estímulos negativos como dolor, maltrato o cambios de ordeñadores o máquinas, entre otros, que inducen la liberación de catecolaminas (Bruckmaier & Wellnitz, 2008; Goodman & Grosvenor, 2010).

El vaciamiento de la mama, que como se expresó anteriormente es determinante para estimular la producción láctea, se conoce como control





interno de la secreción láctea. Este mecanismo está regulado por varios componentes: la capacidad de almacenamiento, la capacidad de vaciamiento y el contenido de grasa al inicio y final del ordeño —debido a que al inicio del ordeño la leche contiene menor cantidad de grasa comparado con el final del ordeño (Valdés & Pérez, 1994).

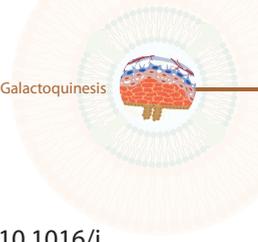
Mientras que la leche esté acumulada en el alvéolo, está activo el factor inhibidor de la lactancia (FIL), con lo que la velocidad de producción de leche de los lactocitos disminuye. Estudios *in vitro* sobre FIL demuestran que inhibe la síntesis proteica en el lactocito, interrumpe la secreción del aparato de Golgi y disminuye el efecto estimulante de la prolactina (Marnet & Komara, 2008; Valdés & Pérez, 1994).

Glucocorticoides

El principal glucocorticoide en vacas es el cortisol, pero se sabe poco de la acción de esta hormona durante la galactopoyesis. Algunos autores han reportado una acción en el aumento de la biosíntesis de caseína y el aumento de la captación de glucosa en las CEM (Bergan-Roller & Sheridan, 2018).

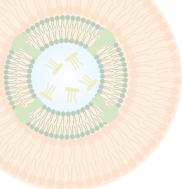
Bibliografía

- Akers, R. M. (2016). Chapter endocrine, growth factor, and neural regulation of mammary function. In *Lactation and the mammary gland*.
- Akers, R. M. (2017). A 100-Year Review: Mammary development and lactation. *Journal of Dairy Science*. 100 (12), 10332-10352. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12983>
- Angulo, J. O. M. (2007). Fisiología de la reproducción láctea. In *Buenas practicas de producción primaria de leche* (pp. 1–10). Medellín: Editotial Biogenesis.
- Bergan-Roller, H. E., & Sheridan, M. A. (2018). The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone.



- General and Comparative Endocrinology*, 258, 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.028>
- Binart, N., Kelly, P. A., Bachelot, A., Kedzia, C., Kopchick, J. J., Ormandy, C. J., & Hennighausen, L. (2002). The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197(1-2), 127-131. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00286-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00286-1)
- Bruckmaier, R. M. (2005). Normal and disturbed milk ejection in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* 29 (2), 268-73. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.023>
- Bruckmaier, R. M., & Blum, J. W. (2010). Oxytocin Release and Milk Removal in Ruminants. *Journal of Dairy Science* 81 (4), 939-49. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75654-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75654-1)
- Bruckmaier, R. M., & Wellnitz, O. (2008). Induction of milk ejection and milk removal in different production systems. *Journal of Animal Science*. 86 (13 Suppl), 15-20. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0335>
- Buhimschi, C. S. (2004). Endocrinology of lactation. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 31 (4), 963-79, xii. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2004.08.002>
- Chilton, B. S., & Hewetson, A. (2005). Prolactin and Growth Hormone Signaling. *Current Topics in Developmental Biology* 68, 1-23. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)68001-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)68001-5)
- Collier, R. J., Annen-Dawson, E. L., & Pezeshki, A. (2012). Effects of continuous lactation and short dry periods on mammary function and animal health. *Animal*, 6(3), 403–414. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002461>
- De Koster, J. D., & Opsomer, G. (2013). Insulin resistance in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 29(2), 299–322. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.002>
- Etherton, T. D., & Bauman, D. E. (1998). Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews*, 78(3), 745–761. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.745>
- Frasor, J., & Gibori, G. (2003). Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14 (3), 118-23. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(03\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(03)00030-4)





- Goodman, G. T., & Grosvenor, C. E. (2010). Neuroendocrine control of the milk ejection reflex. *Journal of Dairy Science* 66 (10), 2226-35. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(83\)82072-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(83)82072-4)
- Lacasse, P., Lollivier, V., Dessauge, F., Bruckmaier, R. M., Ollier, S., & Boutinaud, M. (2012). New developments on the galactopoietic role of prolactin in dairy ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.12.007>
- Lacasse, P., Ollier, S., Lollivier, V., & Boutinaud, M. (2015). New insights into the importance of prolactin in dairy ruminants. *Journal of Dairy Science* 99 (1), 864-74. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10035>
- Marasco, L. A. (2015). Unsolved mysteries of the human mammary gland: defining and redefining the critical questions from the lactation consultant's perspective. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. <https://doi.org/10.1007/s10911-015-9330-7>
- Marnet, P. G., & Komara, M. (2008). Management systems with extended milking intervals in ruminants: regulation of production and quality of milk 86 (13 Suppl), 47-56. *Journal of Animal Science*.
- McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2003). Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (5), 629-41. [55 \(5\), 629-41 https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(03\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00033-4)
- Perez, J.M. (2010). Fisiología de la prolactina. *Instituto de Investigaciones Biomédicas A. Sols, CSIC/UAM*, 2-14. Retrieved from file:///F:/USB 2/prolactina/Pro lactina 2/19. Fisiología de la prolactina 2015.pdf
- Saleem, M., Martin, H., & Coates, P. (2018). Prolactin biology and laboratory measurement: An update on physiology and current analytical issues. *Clinical Biochemist Reviews*.
- Shemanko, C. S. (2008). Mammary epithelial stem and progenitor cells and the prolactin pathway. *Frontiers in Bioscience* 13, 3940-50. <https://doi.org/10.2741/2982>
- Truchet, S., & Honvo-Houéto, E. (2017). Physiology of milk secretion. Best Practice and Research: *Clinical Endocrinology and Metabolism*, 31(4), 367-384. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>
- Tucker, H. A. (2010). Physiological control of mammary growth, lactogenesis, and lactation. *Journal of Dairy Science* 64 (6), 1403-21. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(81\)82711-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(81)82711-7)
- Valdés, V., & Pérez, A. (1994). *Fisiología de la glándula mamaria y lactancia*. UNICEF Chile, 2015 - unicef.cl



Capítulo 5

Involución

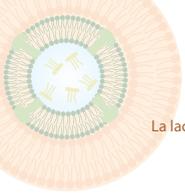
O. Díaz¹, MVZ, MSc.

1. Introducción

La involución de la glándula mamaria es un proceso en el que esta cambia su composición y función: pasa de ser un órgano compuesto principalmente por epitelio secretor a un órgano no secretor. El epitelio secretor es voluminoso y está compuesto en un 90% de células epiteliales mamarias (CEM), mientras que el no secretor es principalmente tejido adiposo. La involución es una muerte extensa de las CEM, acompañada por una regulación positiva de la matriz de metaloproteasas (MMPS) que ayudan a regenerar el estroma celular. En este proceso, adipocitos llenan los espacios que dejan las CEM, aumenta la calicreína que regula la diferenciación e ingresan macrófagos (Watson & Kreuzaler, 2011).

1. Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Grupo Solla S.A, Medellín, Colombia.





2. Involución reversible e irreversible

El iniciador de la involución mamaria es la estasis láctea, que conduce a la acumulación de leche con turgencia de los alvéolos. La presión extracelular aumenta los niveles de serotonina (5-HT) (Figura 1A) en los capilares mamarios; esas concentraciones altas y constantes provocan el rompimiento de las uniones estrechas entre las CEM, facilitando su desprendimiento hacia el lumen alveolar. Cuando inicia la involución comienza la expresión del factor inhibitorio de leucemia (LIF), un activador de la vía de transductores y activadores de las señales de transcripción tipo 3 (STAT3) que induce la apoptosis epitelial (Jena, Jaswal, Kumar & Mohanty, 2018).

Cuando se inicia la involución mamaria (Figura 1) ocurren una serie de eventos locales simultáneos: aumento de la presión intra-alveolar, apoptosis de las CEM por desprendimiento (anoikis), infiltración de neutrófilos, producción de citoquinas, fagocitosis de los detritos celulares por las células epiteliales viables y disminución de la síntesis láctea (Pai & Horseman, 2011; Watson & Kreuzaler, 2011).

El nivel de prolactina (PRL) en sangre mantiene alto el nivel de del tejido inhibidor de las metaloproteinasas (TIMP), el cual es un factor inhibidor de metaloproteinasas (MMP) (Figura 1A). Estas, a su vez, desintegran la matriz extracelular, encargada de mantener compacta la estructura de las CEM. La concentración alta y constante de 5-HT ocasiona la ruptura de las uniones estrechas entre las CEM; induce la migración de neutrófilos hacia el lumen, así como la producción de interleuquina 6 (IL-6), e inhibe poco a poco la sensibilidad de las CEM a la prolactina, por lo que se disminuye la concentración de lactosa, con la consecuente disminución en el transporte de agua por ósmosis (Figura 1B). La interleuquina IL-6 suprime las señales mediadas por STAT5 (Pai y Horseman, 2011) por lo



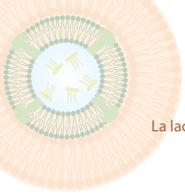
que las células pueden entrar en apoptosis. Por otra parte, se aumenta la concentración de proteínas, especialmente lactoferrina que, además de suprimir la expresión de la caseína, tiene acción bacteriostática (Pai & Horseman, 2011; Sanchez, Calvo & Brock, 1992).

En los primeros tres días de involución, las CEM fagocitan células apoptóticas (Figura 1A), micelas de caseína y glóbulos de grasa láctea con sus vacuolas citoplásmicas (Atabai et al., 2005). El engolfamiento de estos materiales está mediado por el receptor de fosfatidil serina y el factor 8 EGF de los glóbulos de grasa láctea (Mfge8 – lactadherina en humanos) (Hanayama & Nagata, 2005).

Durante las 24 horas de la estasis láctea la involución puede ser reversible siempre que la leche se extraiga y aún estén altos los niveles de prolactina, glucocorticoides y el factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I). En este punto hay un fino balance entre los factores de sobrevivencia o anti-apoptóticos (prolactina, glucocorticoides e IGF-I) y los factores de muerte celular que regulan la regresión epitelial como el 5-HT, las interleuquinas (Ils) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β). El IGF-I pierde disponibilidad por la expresión del regulador de la involución, que es la proteína de unión del factor de crecimiento insulinoide 5 (IGFBP-5) que se une a la IGF-I y la inhibe.

Las CEM se encuentran bajo dos señales, la una para sobrevivir y hacer mitosis y la otra para morir a través de la apoptosis. La proteína kinasa, conocida también como Akt, sirve como centinela en la regulación de las señales de sobrevivencia, mientras que STAT3 y la familia de proteínas de las células B (Bcl2) son el mayor regulador de muerte intracelular (Baxter, Neoh & Tevendale, 2007). La apoptosis ocurre de manera heterogénea por permeabilización de la membrana de las CEM, pero no todo el tejido epitelial sufre apoptosis.





La segunda parte de la involución, que no es reversible, inicia con la fagocitosis profesional de los macrófagos tres días después del inicio del proceso. Comienza con una respuesta primaria de neutrófilos, luego la activación secundaria de macrófagos con respuesta de fase aguda local y, por último, la respuesta de linfocitos B (Pai & Horseman, 2011). Durante la segunda parte de la involución el tejido adiposo blanco sufre un crecimiento exponencial, ya que a medida que ocurre la apoptosis de las CEM este tejido va repoblando el estroma (Watson & Kreuzaler, 2011).

Al inicio de la involución se aumenta la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y sus receptores (por ejemplo: IL-1 α , IL-1 β , IL-13) (Stein et al., 2004). La producción de inmunoglobulinas (Ig) es inducida a los tres días del inicio de la involución; varias de las Ig (IgA, IgM e IgG) son sintetizadas localmente por las células plasmáticas (Pai & Horseman, 2011).

2.1 Remodelación de la matriz extracelular

La fase irreversible de la involución se caracteriza por la remodelación de la matriz extracelular e inicia con la fractura y remoción de la membrana basal (Figura 1B), la cual sirve como ancla a las células epiteliales y mioepiteliales (Watson & Kreuzaler, 2011).

Con el desprendimiento masivo de CEM, el lumen del alvéolo se llena de detritos celulares y las CEM aún viables fagocitan las CEM apoptóticas. El aumento de citoquinas (IL-6) (Kass, Erler, Dembo, & Weaver, 2007). disminuye la sensibilidad de las MEC a la prolactina (PRL), lo que provoca disminución del tejido inhibidor de metaloproteinasas (TIMP). Las IL-6 están encargadas de degradar la matriz extracelular y, al no ser inhibidas por TIMP, degradan los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, la elastina y el colágeno.

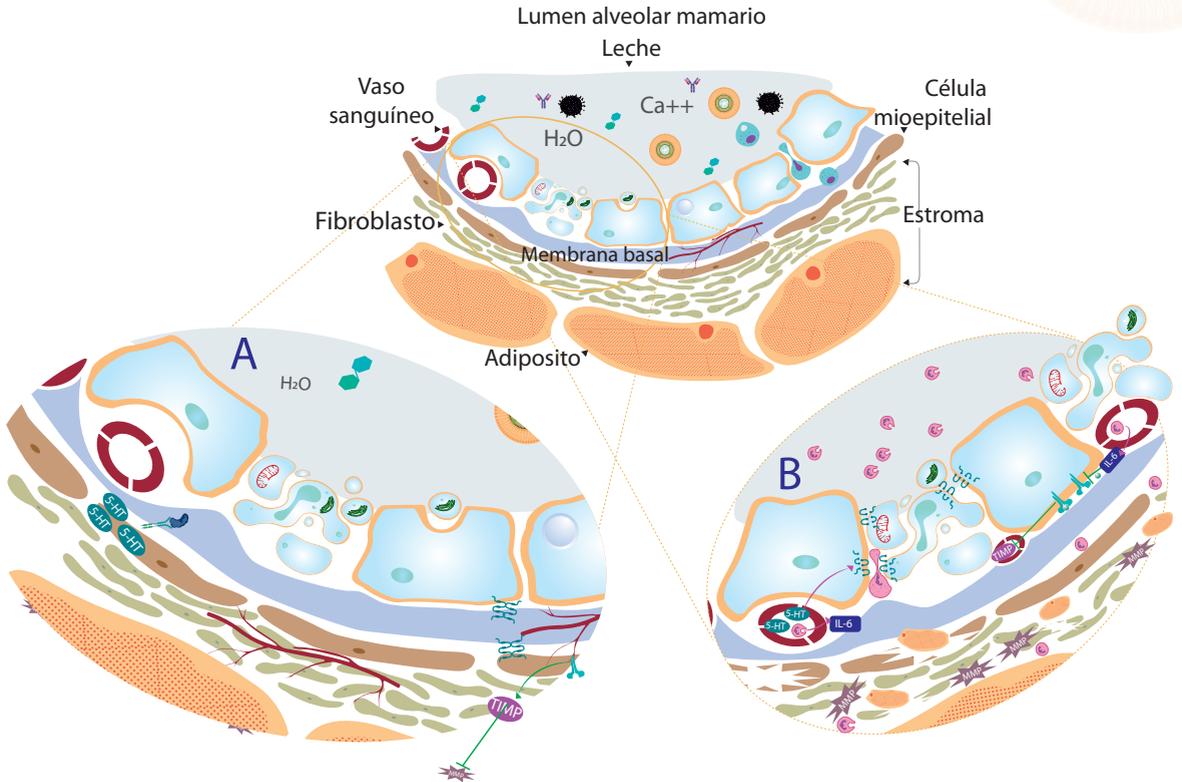
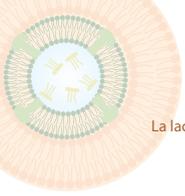


Figura 1. Involución de la glándula mamaria. **Figura 1A.** Involución de la glándula mamaria en los primeros tres días. **Figura 1B.** Involución de la glándula mamaria después del tercer día

Fuente: M Olivera-Angel 2019

Convenciones

 5-HT	 Caseína	 Globulo graso
 Inmunoglobulina	 IL-6	 Lactosa
 Macrófago	 TIMP	 MMP
 Receptor prolactina	 VEGF-VEGFR	 Uniones estrechas



En la lactancia, los fibroblastos del estroma y los adipocitos de la glándula inducen a que las células mioepiteliales sintetizen y secreten componentes de la membrana basal que incluyen laminina, colágeno, fibronectina e integrinas acopladas ($\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ y $\beta 4$) a la superficie de las células epiteliales basales. La matriz extracelular en la mitad de la involución induce la muerte de las CEM, mientras que hacia el final de la involución favorece la formación de estructuras tipo ductos alargados con bifurcaciones (Kass, Erler, Dembo & Weaver, 2007).

Se han asociado dos sistemas con la remodelación de la matriz extracelular mamaria:

- 1) El sistema del plasminógeno (Plg), que incluye los activadores de urokinasa Plg (uPA), de tejido activador de Plg (tPA) y de la kalikreina de plasma (Pkal) y también los inhibidores del activador de Plg (PAIs) y anti-plasmina- $\alpha 2$ de Plg.
- 2) El sistema de enzimas proteolíticas MMP, el cual incluye varias MMP y sus inhibidores, las TIMP (Figura 1B) (Green & Lund, 2005).

Las MMP juegan varios papeles: inician la remodelación de la matriz extracelular, inducen el llenado de estos espacios con adipositos, inducen la apoptosis de la CEM y además el ingreso de macrófagos (Figura 1B) (Green & Lund, 2005; Schedin, Mitrenga, McDaniel & Kaeck, 2004).

Durante la primera fase de involución, la presencia de altos niveles de hormonas sistémicas tipo PRL y GH mantienen alto el nivel de TIMP y suprimen la expresión de MMP. Esto previene la generación de plasmina y el quiebre tanto de la matriz extracelular como de la membrana basal. En la transición a la segunda fase de la involución, la influencia endocrina disminuye, lo cual resulta en la disminución del inhibidor de las proteasas e inducción de uPA y MMP y genera el quiebre de la matriz extracelular y la membrana basal (Travers et al., 1996).



Diferenciación de adipocitos

La formación del tejido adiposo en la glándula mamaria durante la involución puede depender de cuatro aspectos: a) regulación hormonal, b) cambios transcripcionales y metabólicos, c) remodelación de matriz extracelular de adipocitos y d) vascularización del tejido adiposo.

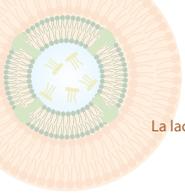
a) Regulación hormonal:

La regulación hormonal está mediada principalmente por la PRL, cuya función sobre el tejido graso está encaminada a la diferenciación de pre-adipocitos. La supresión de PRL provoca la adipogénesis y aumenta los niveles de leptina, mientras que su suplementación previene la adipogénesis e inhibe la leptina. La leptina es la hormona que provoca la diferenciación de los pre-adipocitos a los adipocitos. A los 10 días de involución, la leptina está en el pico más alto, lo que indica su papel en la adipogénesis (Pai & Horseman, 2011). Pai & Horseman (2011) describen la 5-HT como el factor autocrino-paracrino que facilita la transición de la glándula mamaria desde la lactancia a la involución. La diferenciación de pre-adipocitos depende del cambio de receptores de 5-HT y pueden ser estimuladores (5-HT_{2A}) o inhibidores (5-HT₁).

b) Cambios transcripcionales y metabólicos:

La disminución en los niveles sistémicos de GH y PRL resulta en cambios morfológicos en los pre-adipocitos y en la regulación de los factores de transcripción como el receptor γ -proliferador-activador de peroxisoma (Tizard, 2013) y la proteína β -CCAAT-potenciador de unión (C/EBP- β) (Selvarajan, Lund, Takeuchi, Craik & Werb, 2001). Hay un rápido cambio en la actividad de enzimas como Acyl-CoA aciltransferasa colesterol (ACAT) y Acyl-CoA carboxylasa (ACC); esto representa una reducción coordinada de síntesis de lípidos en el tejido





glandular con lipogénesis elevada y almacenamiento de triglicéridos, diferenciando los pre-adipocitos a los adipocitos (Chavey et al., 2003).

c) Remodelación de la matriz extracelular de adipocitos

Mientras que las MMP inhiben el proceso de diferenciación de los adipocitos, las TIMPs estimulan directamente su diferenciación a partir de los pre-adipocitos (Alexander, Selvarajan, Mudgett & Werb, 2001). Además, estimulan la adipogénesis por vía de inducción de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP- β (Chavey et al., 2003). La remodelación de la matriz extracelular de los adipocitos favorece su expansión y la formación de la almohadilla grasa (Chavey et al., 2003).

d) Vascularización del tejido adiposo:

La remodelación vascular sirve para suplir nutrientes, principalmente lípidos, requeridos en la adipogénesis. Consiste en dos grandes eventos: regresión vascular y angiogénesis. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el regulador más estudiado de la vasculatura mamaria. La fagocitosis del tejido epitelial mamario durante la transición al periodo seco resulta en una potente secreción de VEGF (Pepper et al., 2000).

3. Remodelación vascular

Durante la lactancia, la vasculatura está compuesta de una red de capilares altamente desarrollada en forma de panel, tipo cesta, que envuelve cada alvéolo secretorio. Al día tres de involución, la estructura alrededor del alvéolo exhibe un patrón irregular y colapsado, lo cual sugiere una regulación local de la red vascular. Por el día seis de la involución, la cesta vascular, similar al alvéolo, no está presente y es reemplazada por un racimo de capilares en varios estados de regresión. Por el día 10 de involución la red vascular en la glándula mamaria es similar a la glándula



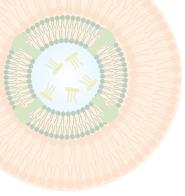
virgen (Djonov, Andres & Ziemiecki, 2001).

Dentro de los reguladores de la remodelación vascular en la involución está el VEGF, secretado por los adipocitos durante la fagocitosis (Pepper et al., 2000). (Figura 1B). La involución de la glándula mamaria también se caracteriza por disminución en la secreción de VEGF epitelial, acompañada por disminución en el receptor de VEGF (VEGFR) en las células del estroma adyacente. Otros reguladores de la remodelación vascular son la PRL clivada y el 5-HT. La PRL tiene una potente señal angiogénica, pero de manera clivada (16K) es altamente anti-angiogénica. La 5-HT es vasoactiva y mitogénica en las células del músculo liso vascular y endotelial. La acción mitogénica de 5-HT puede ser mediada por la secreción de VEGF vía activación sostenida de p38MAPK (Pai & Horseman, 2011).

Bibliografía

- Alexander, C. M., Selvarajan, S., Mudgett, J., y Werb, Z. (2001). Stromelysin-1 Regulates adipogenesis during mammary gland involution. *The Journal of Cell Biology*, 152 152(4), 693-670.
- Atabai, K., Fernandez, R., Huang, X., Ueki, I., Kline, A., Li, S.,... Sheppard, D. (2005). Mfge8 is critical for mammary gland remodeling during involution. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 5528-5537.
- Baxter, F. O., Neoh, K., y Tevendale, M. C. (2007). The beginning of the end: death signaling in early involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 12, 3-13.
- Chavey, C., Mari, B., Monthouel, M. N., Bonnafous, S., Anglard, P., Obberghen, E. V., y Tartare-Deckert, S. (2003). Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *The Journal of Biological chemistry*, 278 (14), 11888-11896.
- Djonov, V., Andres, A. C., y Ziemiecki, A. (2001). Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microscopy Research and Technique*, 52, 182-189.





- Green, K. A., y Lund, L. R. (2005). ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *BioEssays*, 27, 894-903.
- Hanayama, R., y Nagata, S. (2005). Impaired involution of mammary glands in the absence of milk fat globule EGF factor 8. *PNAS*, 102 (46),16886-16891.
- Jena, M. K., Jaswal, S., Kumar, S., y Mohanty, A. K. (2018). Molecular Mechanism of Mammary Gland Involution: An Update. *Developmental Biology*, 445 (2), 145-155 doi. org/10.1016/j.ydbio.2018.11.002.
- Kass, L., Elerb, J. T., Demboc, M., y Weaver, V. M. (2007). Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 39 (11), 1987–1994.
- Pai, V. P., y Horseman, N. D. (2011). *Mammary gland involution: events, regulation and influences on breast disease*. In: Endothelium and Epithelium, Ed. J. Carrasco and Mota, ISBN: 978-1-61470-874-2. pp. 247-284.
- Pepper, M. S., Baetens, D., Mandriota, S. J., Sanza, C. D., Oikemus, S., Lane, T. F., Iruela-Arispe, M. L. (2000). Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Developmental Dynamics*, 218, 507-524.
- Sánchez, L., Calvo, M., y Brock, J. H. (1992). Biological role of lactoferrin. *Archives of disease in Childhood*, 67, 657-661.
- Schedin, P., Mitrenga, T., McDaniel, S., y Kaeck, M. (2004). Mammary ECM composition and function are altered by reproductive state. *Molecular Carcinogenesis*, 41, 207-220.
- Selvarajan, S., Lund, L.R., Takeuchi, T., Craik, C. S., y Werb, Z. (2001). A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat Cell Biol*, 3 (3), 267-275.
- Stein, T., Morris, J. S., Davies, C. R., Weber-Hall, S. J., Duffy, M. A., Heath, V. J.,... Gusterson, B. A. (2004). Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Research*, 6 (2), R75-R91.
- Travers, M. T., Barber, M. C., Tonner, E., Quarrie, L., Wilde, C. J., y Flint, D. J. (1996). The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: relationships to milk synthesis and secretion. *Endocrinology*, 137 (5), 1530-1539.
- Watson, C. J., y Kreuzaler, P. A. (2011). Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 757-762.



Capítulo 6

Receptores hormonales que afectan directa o indirectamente la función de la glándula mamaria

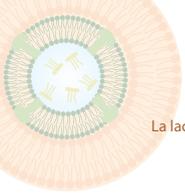
M. Olivera-Angel¹ MV, Dr. Sci.Agr.

1. Introducción

De apegarse a la definición tradicional de hormona, a saber, la sustancia producida por una glándula que viaja a un órgano blanco vía sanguínea, hoy en día sustancias como los neurotransmisores y los factores de

1. Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia.



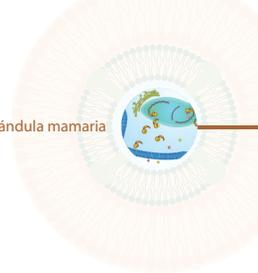


crecimiento también podrían considerarse hormonas. Los neurotransmisores se liberan entre espacios sinápticos o entre terminaciones nerviosas, ejercen su efecto en la misma célula blanco (Figura 1) e inducen funciones hormonales. Los factores de crecimiento pueden ser producidos por la misma célula blanco, induciendo una función autocrina, o pueden producir efecto sobre la célula vecina en forma paracrina. Así, todas aquellas moléculas que se producen en algún lugar, no solamente en una glándula, y que son liberadas para que su acción se produzca en el mismo lugar o en otro —así, nuevamente, no sea una glándula— se consideran hoy en día hormonas.

En este capítulo se muestran los diferentes tipos de receptores hormonales que se encuentran en un órgano blanco y que, a través de la acción conjunta cuando la hormona específica se liga, desencadenan una acción directa o indirecta en la glándula mamaria.

2. Endocrinología de la glándula mamaria

La homeostasis o tendencia al equilibrio sucede en todas las fases de la lactancia y se debe a que existe una coordinación entre el hipotálamo, el cerebro y la hipófisis, las cuales a su vez ejercen una acción coordinada entre el sistema nervioso y el sistema endocrino. Algunas hormonas que se producen en la hipófisis anterior, como la prolactina, tienen efectos directos en la glándula mamaria, mientras que otras, como la FSH, tienen efectos indirectos a través de la inducción de producción de estrógenos que actúan directamente en la CEM. En el hipotálamo, las hormonas secretadas por las neuronas entran directamente al sistema porta-hipofisario que drena en la hipófisis anterior, con lo que logran que mínimas cantidades de sustrato puedan regular la actividad del órgano blanco.



Las hormonas reguladoras de la glándula mamaria se clasifican en mamogénicas, lactogénicas y galactopoyéticas. Las hormonas mamogénicas y algunos factores de crecimiento tienen un efecto en el desarrollo y crecimiento de la glándula; las moléculas lactogénicas actúan promoviendo la diferenciación estructural o la diferenciación bioquímica del epitelio alveolar que sintetiza y secreta leche y las hormonas galactopoyéticas, una vez establecida la lactancia, mantienen o promueven la producción de leche.

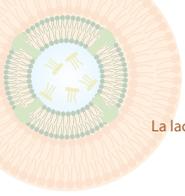
3. Clasificación de los receptores de las secreciones endocrinas que regulan la glándula mamaria

La prolactina, la hormona de crecimiento (GH), la oxitocina y el lactógeno placentario son hormonas lactogénicas que se ligan a su receptor específico localizado en la membrana de la CEM, lo que desencadena cambios bioquímicos intracelulares. Otras hormonas y factores de crecimiento que también inducen funciones específicas en la glándula mamaria, como la insulina, el factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGFI) y el factor de crecimiento epidermal (EGF), también tienen sus receptores en la membrana citoplasmática de la CEM. Las hormonas que actúan ligándose sobre la superficie celular se consideran las primeras mensajeras. Las moléculas críticas, que son influenciadas por la unión de la hormona y su receptor, se consideran segundas mensajeras. Se han definido dos clases de receptores involucrados en estas vías de transducción: los receptores de membrana y los receptores nucleares.

3.1 Receptores de membrana

Los receptores de membrana son diferentes en cuanto a su forma física y química y se unen específicamente a un ligando, en este caso una hor-





mona. Una vez activados los receptores por su unión al ligando (primer mensajero) inducen la acción de un segundo mensajero. Este proceso se llama señalización. A continuación, se explican los diferentes tipos de receptores de membrana y la vía que activan para señalar.

a) Receptores que son canales iónicos

La neurona presináptica secreta un neurotransmisor que induce en la neurona postsináptica la apertura de canales iónicos de Na, despolarizando la membrana de la neurona postsináptica.

Las neuronas presinápticas de la GnRH usan esta vía (Figura 1) (Kadokawa, Pandey, Nahar, Nakamura, & Rudolf, 2014; Roch, Busby, & Sherwood, 2014). El potencial de acción al llegar al botón presináptico genera exocitosis de GnRH al sistema portahipofisario.

b) Receptor transmembranal unido a la proteína G.

La proteína G es una proteína ubicua hetero-trimérica, es decir, compuesta por tres partes, las subunidades α , β y δ , ancladas al receptor transmembrana citoplasmático. Una vez la hormona se une a su receptor, la subunidad α se modifica y activa otra proteína que también está ligada a la membrana. La función se puede ejercer a través de dos mecanismos: (i) la apertura de un canal iónico de Ca como en el caso de GnRH (Figura 2), que induce la liberación de las hormonas FSH o LH al sistema sanguíneo, o (ii) la activación de una enzima como la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3), como es el caso de la oxitocina (OT) que una vez unida a su receptor induce una función, en este caso en el miocito donde se produce una contracción. Estas dos hormonas son ejemplos de unión a su receptor que inducen la función a través de la activación de la proteína G (Crowley, 2011; Hervé, Lollivier, Quesnel, & Boutinaud, 2018).

c) Los receptores ligados a enzimas.

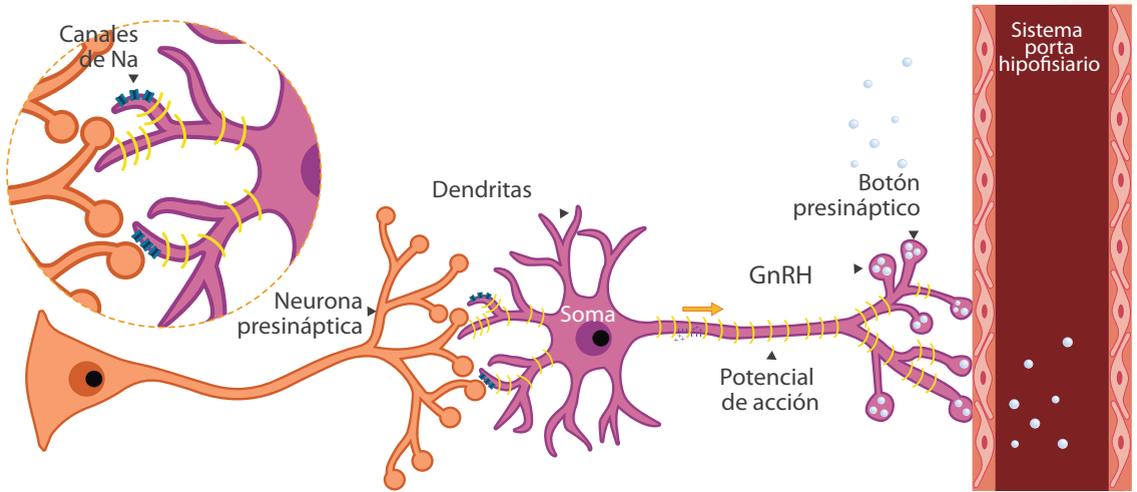


Figura 1. Receptor de membrana, acción a través de canales iónicos por las neuronas presinápticas

Fuente: C. Giraldo, M Olivera-Angel 2019

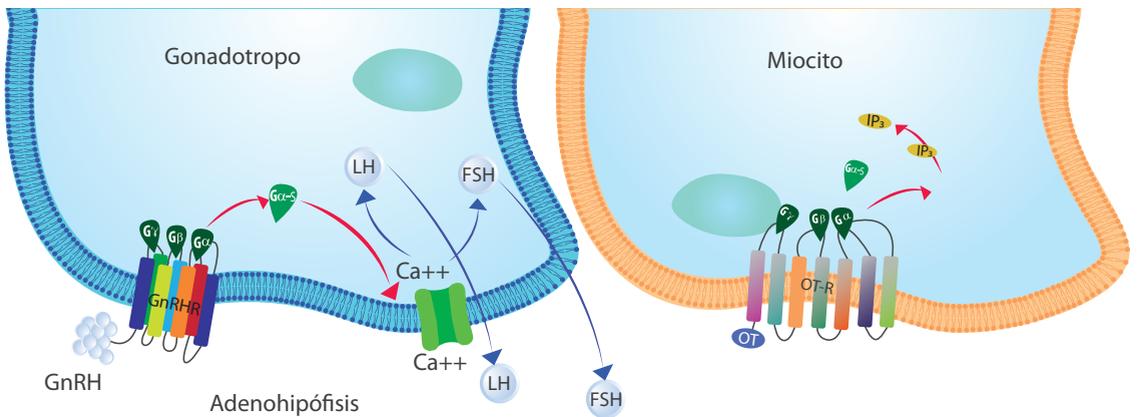


Figura 2. Receptor de membrana, acción a través de la unión a la proteína G

Fuente: M Olivera-Angel 2019



Muchos de estos receptores hormonales son de la familia de las tirosinas quinasas, que incluyen las serinas-treoninas. Las más conocidas en la actividad endocrina son el grupo de enzimas relacionadas con procesos de crecimiento y sobrevivencia, como la AKT —una enzima del tipo de las proteínas kinasas serina-treonina conocida también como proteína kinasa B—, que colaboran en la transferencia de señales dentro de la célula (Figura 3).

La enzima *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) también cola-

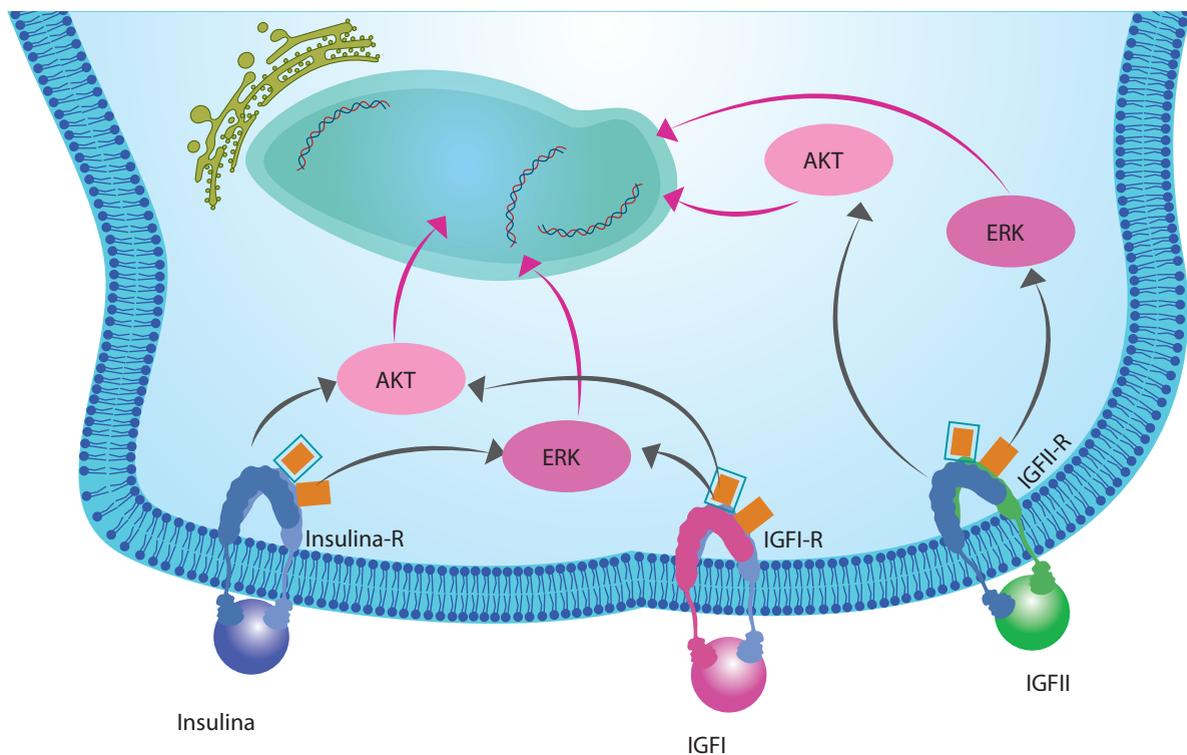
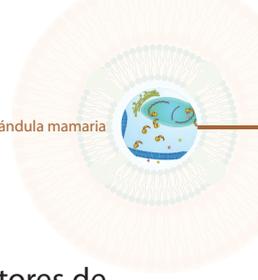


Figura 3. Receptores de insulina, IGF1, e IGFII ligados a las respectivas hormonas. Estos receptores están ligados a las enzimas ERK y AKT.

Fuente: M Olivera-Angel 2019



bora con la transferencia de señales de las hormonas o factores de crecimiento unidos a su receptor. La hormona unida a su receptor activa este tercer mensajero, el cual, a su vez, fosforila las proteínas celulares requeridas para inducir una función (Figura 3). Las hormonas más conocidas que usan este tipo de mecanismo son la IGF-I, la insulina y el EGF (Blum & Baumrucker, 2002).

d) **Receptores homodímeros.**

Estos receptores son proteínas en forma homodimérica (Figura 4). El ligando, es decir la hormona, se une a su receptor y se crea un complejo inactivo; este último migra por la membrana y se unen a otro complejo inactivo. Esta unión o dimerización induce la activación de la Janus quinasa 2 (JAK2), que a su vez fosforila una proteína de la familia de transductores y activadores de las señales de transcripción (STAT). De esta forma se desencadena la función de la hormona (Kitayama et al., 2016). La hormona prolactina y la hormona GH son ejemplos de moléculas cuyo receptor se debe homodimerizar para inducir la acción (Dehkhoda, Lee, Medina, & Brooks, 2018).

3.2 Receptores nucleares

Los receptores nucleares son activados por hormonas que difunden a través de la membrana citoplasmática. Estas hormonas son pequeñas moléculas hidrofóbicas que atraviesan la membrana, transportadas desde el citoplasma por una proteína chaperona que las introduce al núcleo en donde se unen al complejo receptor-chaperonina. Así la hormona puede disociarse de la chaperona y se une a su sitio específico del DNA. El producto es un RNA mensajero que va al ribosoma para su



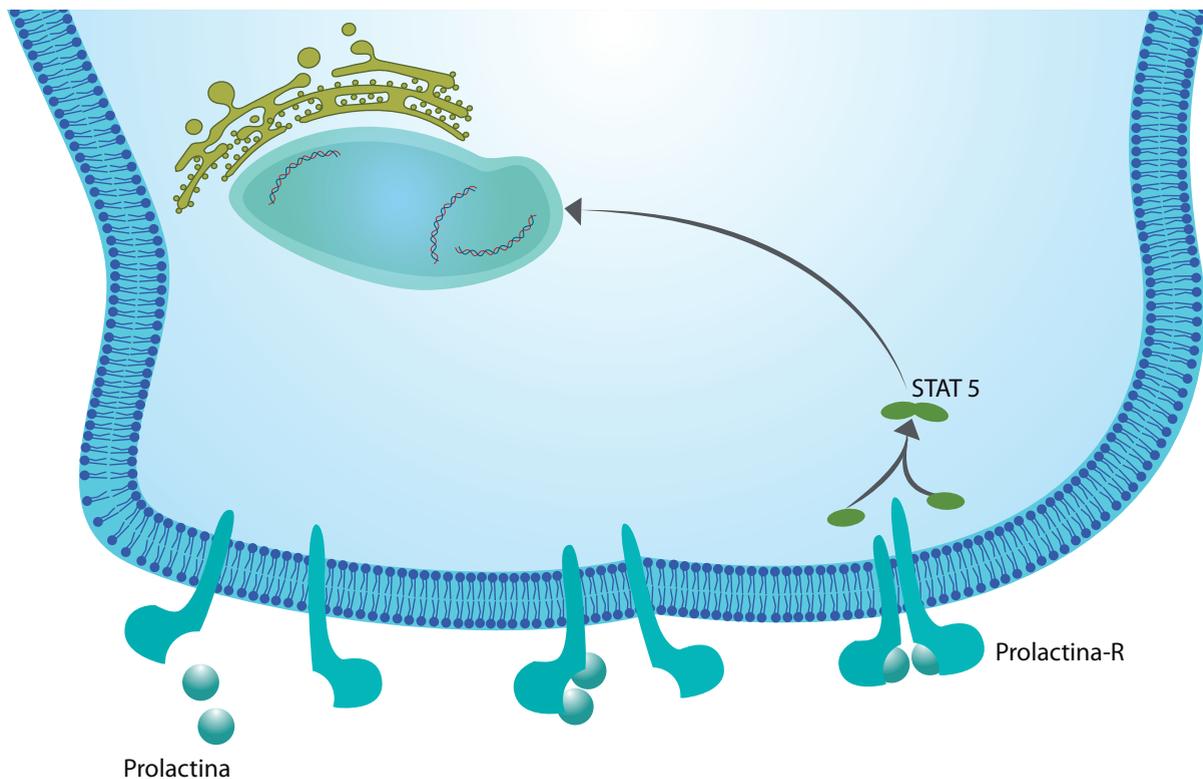


Figura 4. Dimerización de los receptores unidos a sus hormonas específicas como la GH y la prolactina

Fuente: M Olivera-Angel 2019

traducción en proteínas, las cuales ejercen la función inducida por la hormona (Arboccó, Sasso, Nasif, Hapon, & Jahn, 2015) (Figura 5).

Los estrógenos, la progesterona, el cortisol, la triyodotironina y los retinoides son las hormonas con este tipo de receptor (Cagnet et al., 2018). El tiempo de respuesta a esta acción hormonal es mayor que cuando son hormonas proteicas cuyo efecto es casi inmediato.

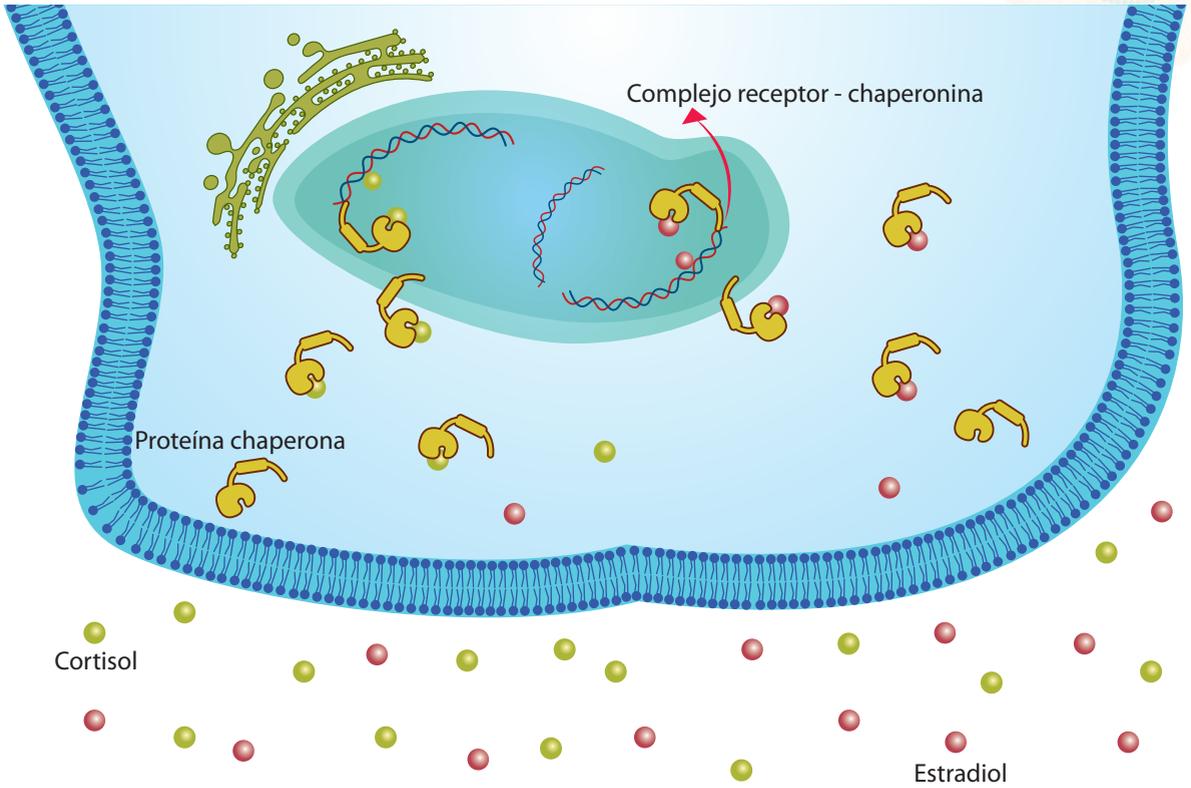


Figura 5. Receptores nucleares para las hormonas esteroidales.

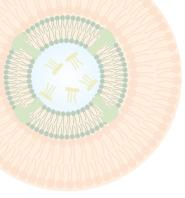
Fuente M Olivera-Angel 2019

Como conclusión se puede afirmar que las respuestas endocrinas están mediadas por la unión de estas a sus receptores y que la función que ejercen es siempre a través de segundos o terceros mensajeros.

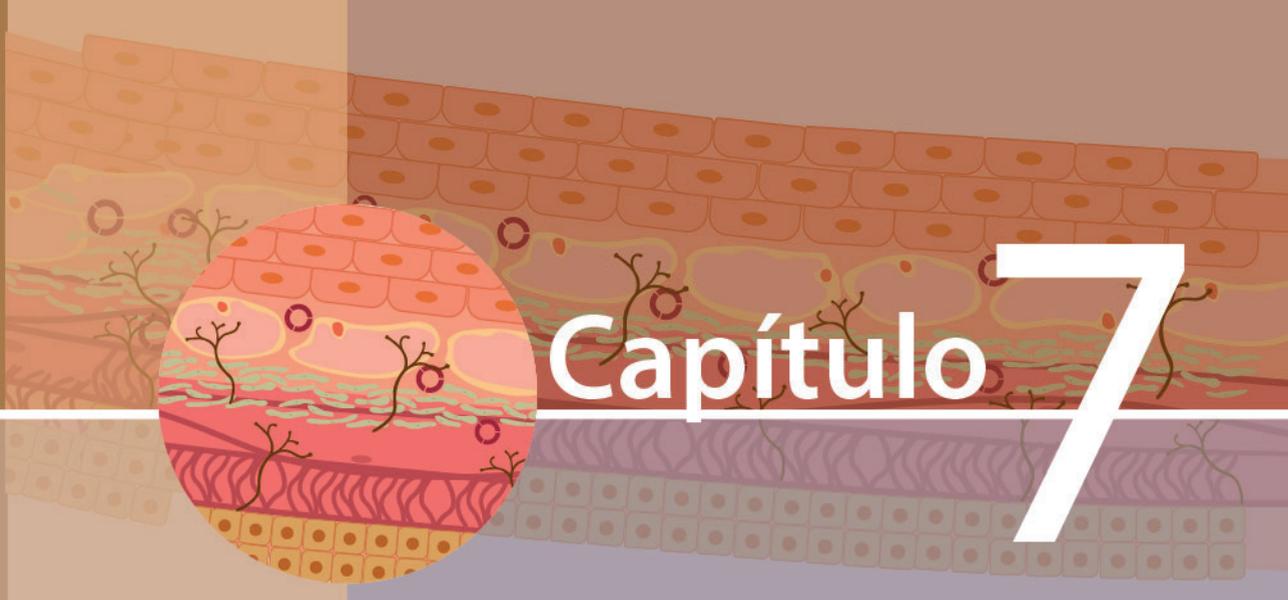
Bibliografía

Arboccó, F. C. V., Sasso, C. V., Nasif, D. L., Hapon, M. B., & Jahn, G. A. (2015). Effect of hypothyroidism on the expression of nuclear receptors and their co-regulators in mammary gland during lactation in the rat. *Molecular and cellular endocrinology*, 412, 26-35.





- Blum, J., & Baumrucker, C. (2002). Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2), 101-110.
- Cagnet, S., Ataca, D., Sflomos, G., Aouad, P., Schuepbach-Mallepell, S., Hugues, H., . . . Brisken, C. (2018). Oestrogen receptor α AF-1 and AF-2 domains have cell population-specific functions in the mammary epithelium. *Nature communications*, 9(1), 4723.
- Crowley, W. R. (2011). Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. *Comprehensive Physiology*, 5(1), 255-291.
- Dehkhoda, F., Lee, C. M., Medina, J., & Brooks, A. J. (2018). The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. *Frontiers in endocrinology*, 9, 35.
- Hervé, L., Lollivier, V., Quesnel, H., & Boutinaud, M. (2018). Oxytocin induces mammary epithelium disruption and could stimulate epithelial cell exfoliation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 23(3), 139-147.
- Kadokawa, H., Pandey, K., Nahar, A., Nakamura, U., & Rudolf, F. O. (2014). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors of cattle aggregate on the surface of gonadotrophs and are increased by elevated GnRH concentrations. *Animal reproduction science*, 150(3-4), 84-95.
- Kitayama, M., Mizutani, K., Maruoka, M., Mandai, K., Sakakibara, S., Ueda, Y., . . . Takai, Y. (2016). A novel nectin-mediated cell adhesion apparatus that is implicated in prolactin receptor signaling for mammary gland development. *Journal of Biological Chemistry*, 291(11), 5817-5831.
- Roch, G. J., Busby, E. R., & Sherwood, N. M. (2014). GnRH receptors and peptides: skating backward. *General and comparative endocrinology*, 209, 118-134.



Capítulo 7

Respuesta inmune innata de la glándula mamaria

L.M. Gomez¹, MVZ, MSc, Dr.Sci,

J.C. Rodriguez-Lecompte², MVZ, MSc, PhD, M.

M. Olivera-Angel³, MV, Dr. Sci Agr.

1.Introducción

La inmunidad innata es el conjunto de mecanismos que actúan contra todos los microorganismos patógenos desde su primer contacto. Es inmediata, no específica, por cuanto no diferencia la clase o especie

1. Director de Investigación, Alura Animal Health and Nutrition.

2. Department of Pathology and Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Molecular Immunology Laboratory.

3. Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia.



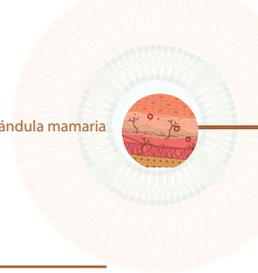


del agresor y no deja memoria del encuentro con el mismo. Si no logra controlarlo, induce una serie de procesos que llevan al desarrollo de la inmunidad adquirida (Rojas et al, 2017). La inmunidad innata tiene los siguientes componentes: factores constitutivos, barreras naturales, moléculas de reconocimiento, células, sistemas enzimáticos, fagocitosis e inflamación (Rojas et al, 2017).

Este tipo de inmunidad es la línea de defensa inicial cuando la glándula mamaria está expuesta a microorganismos causantes de mastitis (Rainard & Riollet, 2006). En dicho órgano, los componentes más importantes de la inmunidad innata son: el canal de la teta o pezón, que actúa como una barrera física y fuente de sustancias antimicrobianas, y algunas células y moléculas que facilitan la protección de esta (Sordillo, 2018) (ver Tabla 1).

Tabla 1. Funciones de los componentes de la inmunidad innata

Factor	Función principal
Canal del pezón	Músculos del esfínter que se contraen para bloquear la penetración bacteriana
	La queratina tiene actividad bacteriostática y forma una barrera
Receptores reconocedores de patrones (PRR)	Reconocimiento bacteriano y activación de la respuesta inflamatoria
Complemento	Bacteriolítico, facilita fagocitosis (opsonización)
Lactoferrina	Secuestro de hierro necesario para crecimiento bacteriano
Citoquinas	Inmunomodulación de la respuesta inmune innata
Oxilipinas	Regulación de microvasculatura
	Orquestación de respuestas proinflamatorias y de resolución de la inflamación
Células epiteliales	Reconocimiento de patógenos por PRR
Células endoteliales	Control del flujo sanguíneo para tejidos afectados
	Regulación de la migración y activación de leucocitos



Neutrófilos	Fagocitosis y eliminación de bacterias por la producción de radicales libres, enzimas antibacterianas y defensinas
	Formación de NETs (trampas extracelulares de neutrófilos)
Macrófagos	Fagocitosis y eliminación de bacterias
	Producción de citoquinas inmunoreguladoras y oxilípidos
	Remoción de detritos celulares
Células dendríticas	Fagocitosis de bacterias
	Producción de citoquinas
Células asesinas naturales	Identifica y ayuda a eliminar células infectadas del hospedero. Secreción de proteínas antibacterianas.

Fuente: Adaptado de Sordillo (2018)

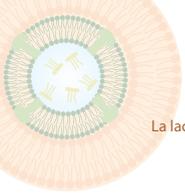
2. Defensas externas o barreras físicas del pezón

Las barreras físicas del pezón inician con la piel de epitelio escamoso estratificado, cuya última capa es de células muertas recubiertas de queratina, continúan con el tapón de queratina y terminan con el músculo circular del esfínter (Craven & William, 1985). (Figura 1).

Respecto al epitelio externo del pezón, cuando está intacto, se convierte en un medio hostil para el desarrollo de las bacterias porque inhibe su crecimiento. El canal del pezón después del epitelio está compuesto por fibroblastos, células grasas, músculo liso, vasos y nervios. El músculo liso se localiza en formas transversa, oblicua y longitudinal y termina en el esfínter que mantiene el cierre entre ordeños y evita la penetración de bacterias (Bitman et al., 1991; Paulrud, 2005). La anatomía del pezón se puede ver en la Figura 1.

La longitud del canal del pezón es de entre 5 y 13mm; está conformado por pliegues de epitelio cúbico queratinizado y cubierto por una capa

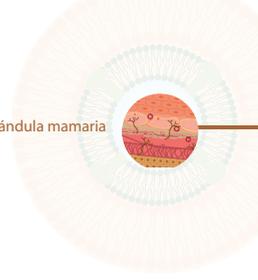




delgada de lípidos. Estos últimos son ácidos grasos (mirístico, palmitoleico y linoleico) que tienen actividad bactericida y bacteriostática preferencialmente sobre bacterias gram-positivas y más limitada sobre gram-negativas (Bitman et al., 1991; Craven & Williams, 1985). Entre ordeños el canal está cerrado por la contracción de los músculos que forman los pliegues y está sellado con un tapón de queratina, material ceroso producido por el epitelio cúbico que reviste el canal; esta sustancia crea una obstrucción física a las bacterias, especialmente en el período seco de la vaca. Cuando se ordeña, los primeros chorros de leche lavan el tapón de queratina y el canal del pezón se abre; al finalizar el ordeño, el canal permanece abierto al menos por dos horas (Paulrud, 2005). La única vía de acceso a la ubre es a través del orificio del pezón. Adicionalmente, el canal del pezón contiene proteínas ligadoras de calcio, a las cuales se les ha reportado actividad antimicrobiana (Smolenski, Cursons, Hine, & Wheeler, 2015). De esta manera, la glándula mamaria limita el acceso de microorganismos del exterior al lumen intramamario.

La leche de las vacas sanas contiene microbiota propia: *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Pelomonas*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Aeribacillus*, *Lachnospiraceae*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Clostridiales*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Xanthomonadaceae*, *Bacteroidales*, *Lactobacillus*, *Porphyromonas*, entre otras (Addis et al., 2016). Esta microbiota es adquirida por el paso de la misma desde el intestino materno, por la migración de las células plasmáticas hasta la glándula mamaria.

El epitelio de la piel y el canal del pezón pueden estar colonizados por bacterias como *Staphylococcus* que en algún momento se pueden volver patógenas. Un estudio realizado en 1.358 canales de tetas de vacas clínicamente sanas mostró que el 84.5% tuvo al menos un microorganismo patógeno (Paduch & Krömker, 2011).



3. Defensas internas o intrínsecas

Lactoferrina

El hierro (Fe) es una de las fuentes requeridas para el crecimiento de la *E.coli*. Cuando la ubre está seca, la lactoferrina remueve el Fe de la ubre y así minimiza la multiplicación bacterial. Sin embargo, la acción de la lactoferrina durante la lactancia es menor debido a la dilución de esta enzima en el total de la leche y al citrato que contiene la leche, el cual compite con la lactoferrina por el Fe. El citrato de Fe puede ser usado por las bacterias como sustrato para su crecimiento (Nelson et al., 2018).

Lactoperoxidasa

Esta enzima puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias Gram positivas y matar algunas Gram negativas. Sin embargo, para que actúe la lactoperoxidasa se requiere tiocianato, cuyas concentraciones en leche dependen de la alimentación. Además, para que la enzima actúe se requiere peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es producido por las mismas bacterias (Burton & Erskine, 2003).

Complemento

Son proteínas que cuando actúan unidas producen una cascada que pueden matar la *E. coli*. No todas las coliformes son sensibles al complemento, especialmente las causantes de mastitis severas. (Sordillo, 2018).

4. Mecanismos de defensa inducibles

Reconocimiento de patógenos

La glándula mamaria tiene mecanismos para censar patógenos y así iniciar la activación de la inflamación. Las poblaciones celulares locales son



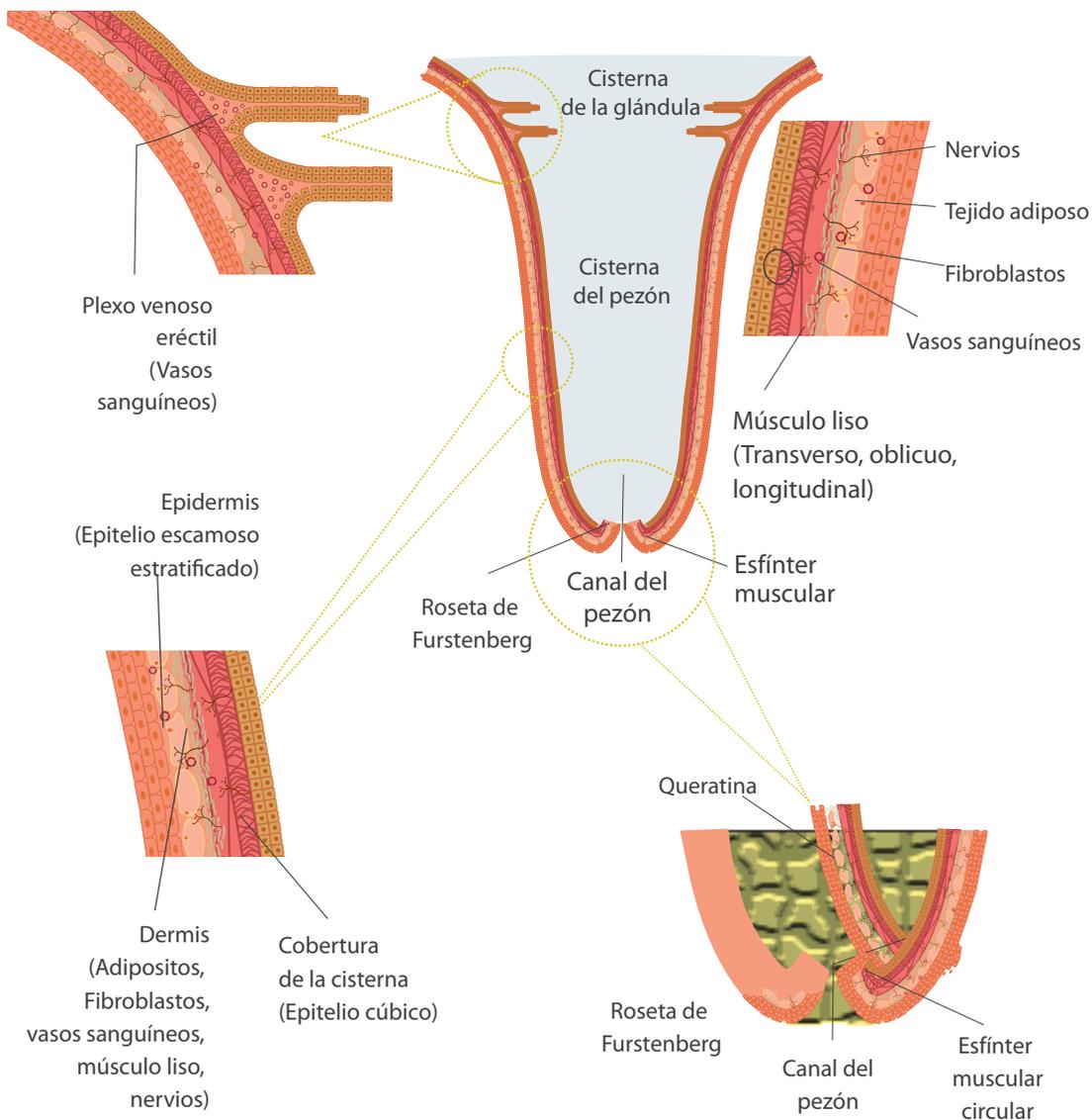
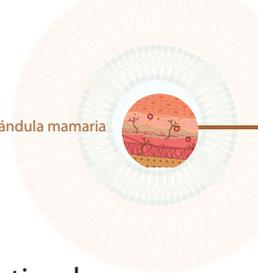


Figura 1. Estructura anatómica del pezón

Fuente: Olivera-Angel M, 2019



capaces de facilitar el reconocimiento de patógenos y pueden estimular varios procesos inmunológicos a través de la expresión de PRR. Estos procesos pueden interactuar con una diversidad de arreglos moleculares llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que son inmunógenos típicos de los microorganismos patógenos.

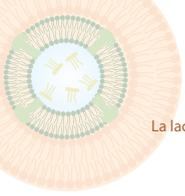
Un ejemplo de estos son los receptores tipo Toll (TLR), los cuales no solo se expresan en leucocitos sino también en las células epiteliales, endoteliales y fibroblastos de la glándula mamaria (Ibeagha-Awemu et al., 2008). Los TLR-2 y TLR-4 son los más importantes en la defensa inmune innata de la glándula mamaria, ya que son capaces de reconocer PAMPs de bacterias causantes de mastitis tipo Gram positivas (peptidoglicanos) y Gram negativas (lipopolisacáridos, LPS) respectivamente. Una vez se inicia la unión PRR-PAMP se activan señales intracelulares como la vía del factor de transcripción $\kappa\beta$ (NF κ β), la cual controla la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Liang, Zhou & Shen, 2004).

Activación de la inflamación

La activación de la inflamación es un proceso fundamental en la eliminación del agente que está ocasionando el daño en la glándula mamaria. Un proceso eficiente de respuesta inmune en dicho órgano debería resolverse en menos de una semana y no causar ningún cambio apreciable en la leche o en los tejidos mamarios. Cuando la inflamación es severa, el daño de tejido es inminente y resulta en el desarrollo de una mastitis aguda o crónica descontrolada que contribuye significativamente a la pérdida de producción de leche. (Sordillo, 2018)

La activación del NF- $\kappa\beta$ es la vía de señalización principal en la glándula mamaria, los mediadores solubles que se producen una vez se activa esta vía son los que controlan la inflamación. Durante los estadios iniciales de inflamación en la glándula mamaria se producen grandes can-





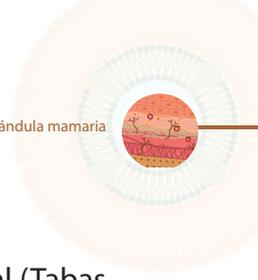
tidades de TNF- α e IL-1 β y en las etapas finales se producen IL-4, IL-10 e IL-17, algunas de las cuales están encargadas de resolver y finalizar la inflamación (Bannerman, 2009).

Otro grupo importante de moléculas de señalización inflamatoria son las conocidas como oxilipinas o eicosanoides. Dependiendo del sustrato de ácido grasos y la vía de oxigenación, las oxilipinas pueden funcionar potenciando o resolviendo la cascada inflamatoria (Mattmiller, Carlson & Sordillo, 2013; Serhan & Chiang, 2008). Por lo tanto, el efecto que las oxilipinas puedan tener sobre la inflamación dependerá del tiempo y la expresión de ciertos perfiles de ácidos grasos durante los procesos de la enfermedad, que a su vez están determinados por la dieta.

Los cambios en el metabolismo lipídico en las vacas de leche durante el parto alteran profundamente la composición y concentración de las oxilipinas en la glándula mamaria. En algunos casos este cambio puede ser responsable de la respuesta inflamatoria disfuncional y por ende de la pérdida en producción de leche (Sordillo, 2018).

Junto con las citoquinas, los oxilípidos tienen la capacidad de interactuar directamente con los vasos sanguíneos en la glándula mamaria y alterar el tono vascular y el flujo sanguíneo en los tejidos afectados. Así, se incrementa la vasodilatación de los capilares y la permeabilidad requerida para la migración de neutrófilos desde el torrente sanguíneo hacia la glándula mamaria, lo cual genera un incremento de los mismos en la leche (Ryman, Packiriswamy & Sordillo, 2015).

La resolución de la inflamación está controlada también por un grupo especial de oxilipinas como las resolvinas, protectinas y lipoxinas, las cuales limitan la infiltración de los neutrófilos a los tejidos afectados al potenciar la acción de los macrófagos en la limpieza de cuerpos apoptó-



ticos y facilitar la restauración de los tejidos a su función normal (Tabas & Glass, 2013).

Células de la inmunidad innata

Durante la inflamación y diversas etapas de la fisiopatología hay reclutamiento de leucocitos residentes y generación de nuevos leucocitos. En homeostasis y ausencia de inflamación, los linfocitos y macrófagos son las células más abundantes en el lumen, con bajo número de neutrófilos. En las horas posteriores a la infección de la glándula mamaria, el conteo de células somáticas (SCC) puede pasar de 10^5 a 10^6 , las cuales en su mayoría son neutrófilos. La movilización de neutrófilos está controlada por citoquinas y oxilipinas, las cuales actúan directamente sobre la vasculatura para causar disminución en el flujo sanguíneo, con un incremento concomitante en la expresión de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales, las cuales a su vez atraen moléculas de adhesión vascular y así facilitan la migración de leucocitos al sitio de la injuria (Hodgkinson, Carpenter, Smith, Molan & Prosser, 2007; Maddox, Aherne, Reddy & Sordillo, 1999). Los neutrófilos se marginan primero y luego se adhieren al endotelio local cerca del sitio de la infección. El movimiento de neutrófilos entre los tejidos se da por la acción de quimioquinas que se producen en el sitio de la lesión (Figura 2).

Los neutrófilos sanguíneos, que se caracterizan por el flujo rápido, circulan por los vasos. Cuando se requiere, se expresa la molécula marcadora funcional y fenotípica llamada CD62L, cuya acción soporta una rápida neutralización de las endotoxinas producidas por la bacteria y actúan como brazos moleculares para los neutrófilos sanguíneos, lo que permite que la velocidad del flujo de los neutrófilos disminuya y las células pueden fijarse a sus ligandos en las células endoteliales (Cano et al., 2017). Estos neutrófilos separados detectan señales bioquímicas



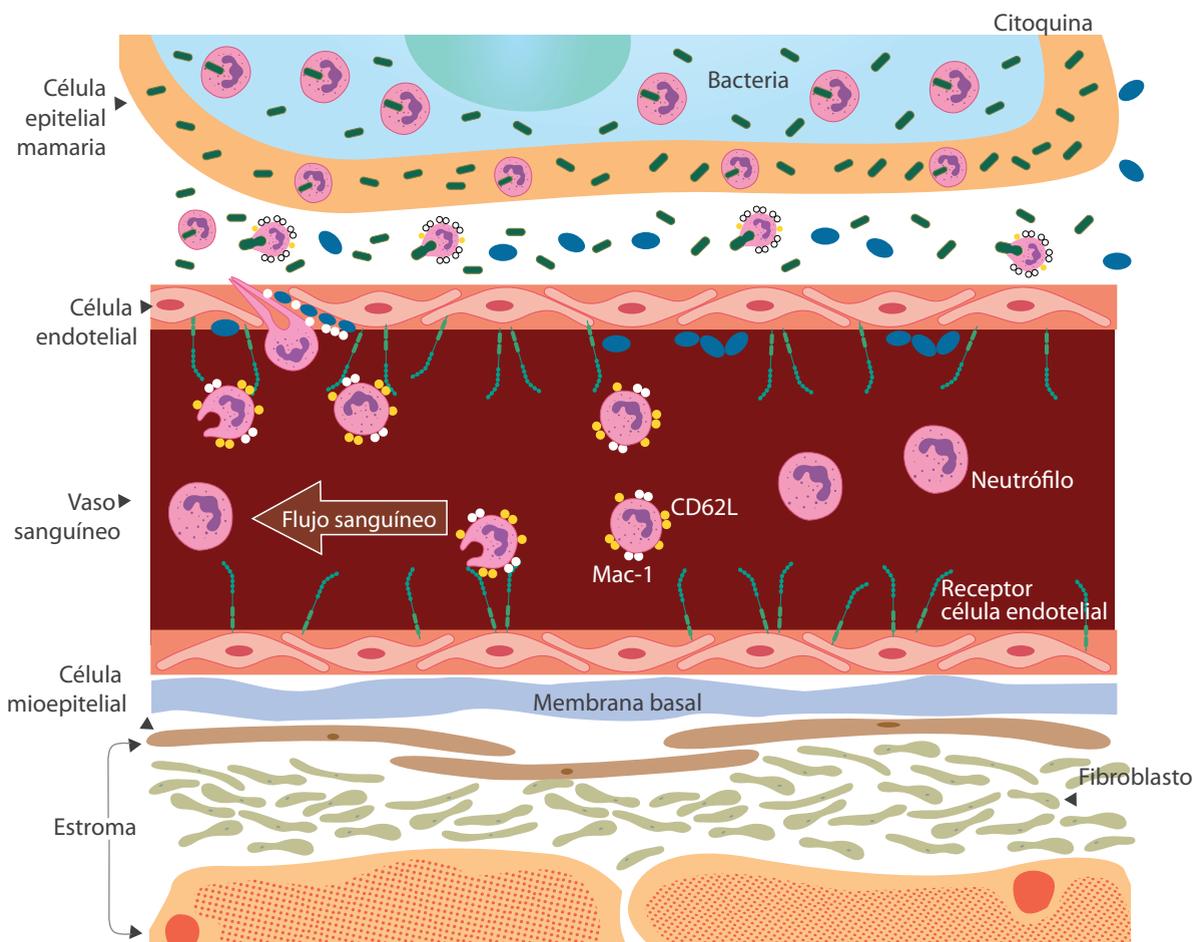
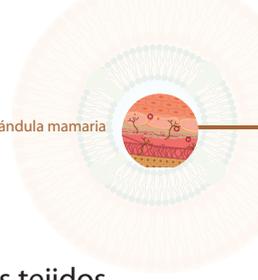


Figura 2. Mecanismo de migración de los neutrófilos de la circulación hacia la glándula mamaria

Fuente: adaptado de Burton & Erskine (2003)

(quimioquinas, citoquinas) en los sitios de la infección. Las células rápidamente se liberan del CD62L (clivaje proteolítico) e incrementa la expresión de receptores de reconocimiento que media la fagocitosis vía opsonización (Mac-1), los cuales son fundamentales para la hiperadherencia. La expresión del Mac-1 induce la expresión de la cadena 2 de la integrina Beta (CD18), lo que permite la migración o diapédesis de los neutrófilos al sitio blanco de la lesión (Burton & Erskine, 2003). La migra-



ción de neutrófilos puede ocurrir muy rápido y acumularse en los tejidos afectados entre 30 y 60 minutos después de la injuria (Sordillo, 2018).

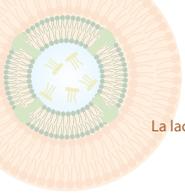
Otro proceso clave es la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos, si bien las células dendríticas también lo pueden realizar en este contexto. Dicho proceso consiste en el englobamiento y encapsulación para su posterior destrucción mediante el estallido respiratorio con especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. También hay ayuda de las enzimas mieloperoxidasa y superóxido dismutasa, que oxidan la membrana de las bacterias y ocasionan su completa destrucción (Cano et al., 2017).

Otro mecanismo de defensa innato del sistema inmune es la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Una vez las bacterias estimulan a los neutrófilos se produce liberación de material del núcleo (ADN e histonas), así como proteínas granulares y fibras extracelulares que funcionan para atrapar y matar microorganismos. Se ha demostrado que las NET proveen un foco de sustancias antibacterianas que se unen y matan bacterias independientemente de la fagocitosis de la glándula mamaria (Grinberg, Elazar, Rosenshine & Shpigel, 2008; Lippolis, Reinhardt, Goff & Horst, 2006). Las NET también sirven como una barrera física que previene la diseminación de las bacterias por los tejidos de la vaca.

Defensas solubles innatas

El componente soluble es el sistema del complemento que juega el papel más importante en la inmunidad innata contra patógenos a través de funciones de opsonización, eliminación de patógenos y quimiotaxis de fagocitos (Rainard, 2003). La cascada de las proteínas genera otro tipo de moléculas tales como como las anafilotoxinas y las opsoninas que facilitan la fagocitosis, el interferón gama (IFN), la proteína C reactiva, la lisozima, defensinas y otras moléculas antimicrobianas. El comple-





mento está presente en la leche de vacas sanas en concentraciones muy bajas (Lopera et al., 2017).

La “vía alterna”, como se conoce esta vía del complemento, es específica para bacterias, hongos y virus. Su forma de acción es depositar en la bacteria las opsoninas C3b y el C3bi, con lo que genera un fragmento proinflamatorio llamado C5a, responsable de iniciar la reacción inflamatoria o booster en la glándula mamaria. La acción de C5a depende de que la CEM exprese receptores en su zona apical, lo cual a su vez altera la permeabilidad epitelial, permitiendo que las fracciones del complemento lleguen a la leche (Rainard, 2003).

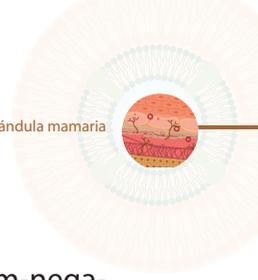
A través de la vía alterna del complemento se induce la acción quimiotáctica y se incita a la migración de los neutrófilos a través del epitelio mamario, los cuales a su vez inducen a la liberación de histamina desde los mastocitos y basófilos, vasodilatación, angiogénesis, permeabilidad vascular y reclutamiento de fagocitos al sitio de la inflamación (Lopera et al., 2017).

El complemento está presente en diferentes estados fisiológicos y patológicos en las vacas de leche. En el calostro, leches de animales sanos y secreciones de vacas secas se encuentra en bajas concentraciones (Rainard, 2003).

En la leche de una vaca sana la concentración de C3 es más baja que en el suero (2.5% del suero vs. 0.5% de la albúmina sérica bovina-ASB), mientras que en leche con mastitis la relación es inversa (Rainard, 2003).

Vía intracrina de la vitamina D (Vit D)

En los macrófagos de la glándula mamaria se da una vía intracrina de la vit D, asociada con los mecanismos de defensa innata de la misma en la mastitis bovina. Este mecanismo se da a través de la generación de óxido nítrico (uno de los más potentes microbicidas) y de la β -defensina



(péptido antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas) que refuerza la acción bactericida (Nelson, Merriman, Poindexter, Kweh & Blakely, 2018).

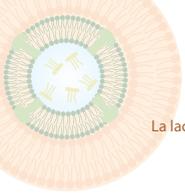
El estímulo de los macrófagos activados mediante la interacción de receptores TLR con las PAMP, como son el LPS y los péptidoglicanos, conduce a la producción de la enzima CYP27B1 e induce el paso de 25 (OH) D3 a 1,25 (OH)₂ D3, que es el metabolito activo de la vit D. La vit D activa a su receptor (VDR) hormonal nuclear que funciona como un factor de transcripción. Así, se produce la expresión de los genes de sintetasa de óxido nítrico inducible (*iNOS*), de β -defensina 3 y otras. El óxido nítrico reacciona dentro del fagolisosoma con las moléculas de radicales libres y forma moléculas nitrogenadas como el peroxinitrito, que contribuye a eliminar la bacteria dentro del macrófago (Nelson et al., 2018).

Cómo llegan a la leche las células somáticas

El reclutamiento local de leucocitos (macrófagos y linfocitos) y neutrófilos en la leche procedentes de la sangre es el mecanismo más importante de defensa de la glándula mamaria bovina. Cuando la ubre se encuentra con una infección activa, los neutrófilos corresponden entre el 59 y el 99% de las células somáticas, dependiendo del estado de lactancia (Burton & Erskine, 2003).

La defensa contra infecciones intramamarias se dificulta por el volumen de leche y sus componentes sólidos como la grasa y las caseínas, que pueden bloquear el reclutamiento de moléculas del sistema inmune. Para superar el problema del volumen de leche, que produce dilución de células y moléculas, la glándula mamaria debe reclutar un sinnúmero de moléculas necesarias para la respuesta inmune local durante la fase aguda inflamatoria. Los principales efectores de dicha respuesta son los neutrófilos y anticuerpos



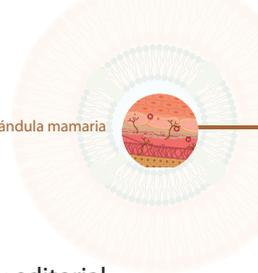


opsonizantes. Las poblaciones bacterianas de *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* pueden duplicarse cada 30 minutos en la glándula mamaria y requieren grandes cantidades de anticuerpos opsonizantes y neutrófilos nuevos (tienen una vida media de 4 horas) en las primeras 12 a 18 horas post-infección para combatirla (Smith, 1994).

Las infecciones intramamarias inducen a un flujo mayor de neutrófilos sanguíneos y pueden llegar a concentraciones tan altas como 4×10^6 /mL en cuestión de horas. Una vaca lactante puede tener un total diario de 2×10^{11} neutrófilos, de los cuales cerca de la mitad están circulando libremente en la sangre y la otra mitad están entre nichos de almacenamiento en médula ósea o adheridos a las paredes de vasos sanguíneos. Existe una relación positiva entre la capacidad que tiene el animal de movilizar neutrófilos a la ubre y la respuesta a las infecciones intramamarias: las vacas que lo hacen más rápido y eficiente son las que mejor resuelven la infección (Paape, Hafs & Snyder, 1963).

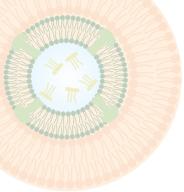
Bibliografía

- Addis, M., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R., & Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from-omics studies. *Molecular BioSystems*, 12(8), 2359-2372.
- Bannerman, D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of animal science*, 87(suppl_13), 10-25.
- Bitman, J., Wood, D., Bright, S., Miller, R., Capuco, A., Roche, A., & Pankey, J. (1991). Lipid composition of teat canal keratin collected before and after milking from holstein and Jersey cows. *Journal of dairy science*, 74(2), 414-420.
- Burton, J. L., & Erskine, R. J. (2003). Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 19(1), 1-45.
- Cano, L.E., Rojas, W., Gomez L.M., Aristizabal, B., Lopera, D. (2017). Granulocitos, Mastocitos, Plaquetas y fibroblastos. En Rojas, W., Anaya, J.M., Gomez, L.M., Aristizabal, B.,

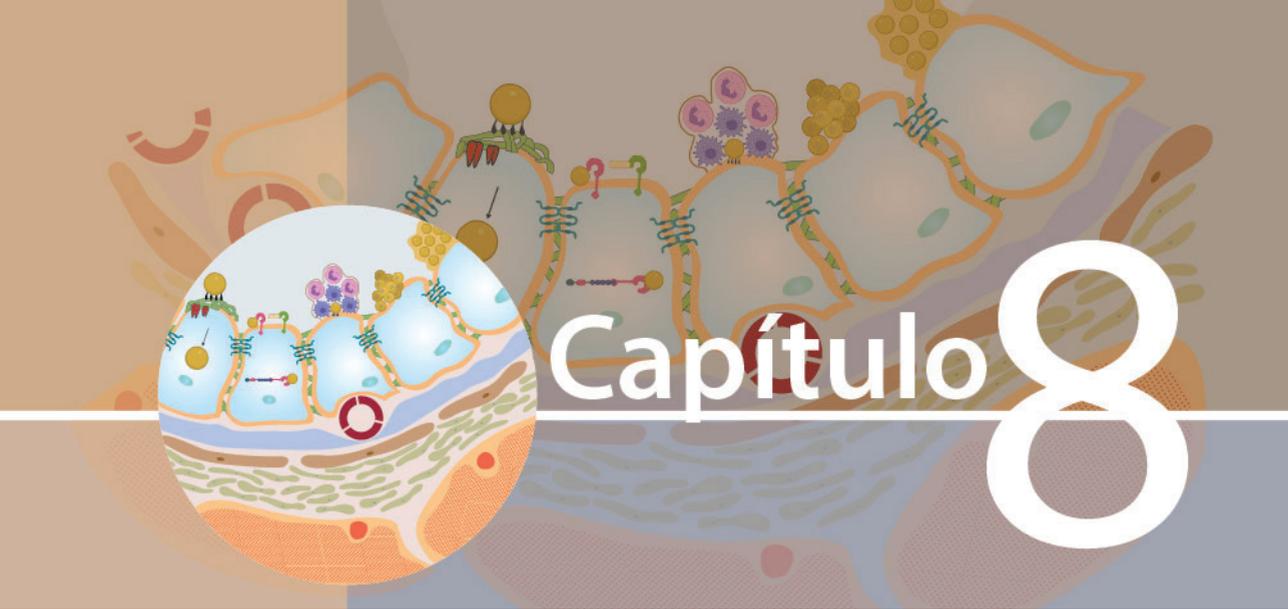


- Cano, L.E., Lopera, D. (eds) *Inmunología*. pp 45-56. Medellín, Colombia: editorial Corporación para Investigaciones Biológicas CIB
- Craven, N., & Williams, M. (1985). Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 10(1), 71-127.
- Grinberg, N., Elazar, S., Rosenshine, I., & Shpigel, N. Y. (2008). β -Hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 76(6), 2802-2807.
- Hodgkinson, A., Carpenter, E. A., Smith, C., Molan, P. C., & Prosser, C. G. (2007). Adhesion molecule expression in the bovine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115(3-4), 205-215.
- Ibeagha-Awemu E.M., Lee J.W., Ibeagha A.E., Bannerman D.D., Paape M.J., Zhao X. (2008) Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet Res*. 39(HASTA ACÁ CURSIVA)(2):11.
- Liang, Y., Zhou, Y., & Shen, P. (2004). NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol*, 1(5), 343-350.
- Lippolis, J. D., Reinhardt, T. A., Goff, J. P., & Horst, R. L. (2006). Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1-2), 248-255.
- Lopera, D., Rojas, W., Cano, L. E., Gomez, L. M., & Aristizabal, B. H. . (2017). Sistema del complemento In W. Rojas, Anaya, J. M., Gomez, L. M., Aristizabal, B. H., Cano, L. E., & Lopera (Ed.), *Inmunología* (pp. 80-93). Medellín, Colombia: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas CIB.
- Maddox, J. F., Aherne, K. M., Reddy, C. C., & Sordillo, L. M. (1999). Increased neutrophil adherence and adhesion molecule mRNA expression in endothelial cells during selenium deficiency. *Journal of leukocyte biology*, 65(5), 658-664.
- Mattmiller, S., Carlson, B. A., & Sordillo, L. (2013). Regulation of inflammation by selenium and selenoproteins: impact on eicosanoid biosynthesis. *Journal of nutritional science*, 2.
- Nelson, C. D., Merriman, K. E., Poindexter, M. B., Kweh, M. F., & Blakely, L. P. (2018). Symposium review: Targeting antimicrobial defenses of the udder through an intrinsic cellular pathway. *Journal of dairy science*, 101(3), 2753-2761.





- Paape, M., Hafs, H., & Snyder, W. (1963). Variation of estimated numbers of milk somatic cells stained with wright's stain or pyronin y–methyl green stain. *Journal of dairy science*, 46(11), 1211-1216.
- Paduch, J., & Krömker, V. (2011). Colonization of the teat skin and the teat canal of lactating dairy cattle by mastitis pathogens. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/ Nutztiere*, 39(2), 71-76.
- Paulrud, C. O. (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary research communications*, 29(3), 215-245.
- Rainard, P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary research*, 34(5), 647-670.
- Rainard, P., Riollet, C., (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. (cursiva) *Veterinary Research* 37(hasta acá la cursiva), 369–400
- Rojas, W., Cano, L. E., Gomez, L. M., Aristizabal, B. H., & Lopera, D. . (2017). Generalidades y definiciones In W. Rojas, Anaya, J. M., Gomez, L. M., Aristizabal, B. H., Cano, L. E., & Lopera, D. (Ed.), *Inmunología* (pp. 3-14). Medellín, Colombia: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas CIB.
- Ryman, V. E., Packiriswamy, N., & Sordillo, L. M. (2015). Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. *Animal health research reviews*, 16(2), 135-149.
- Serhan, C., & Chiang, N. (2008). Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S200-S215.
- Smith, J. A. (1994). Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of leukocyte biology*, 56(6), 672-686.
- Smolenski, G. A., Cursons, R. T., Hine, B. C., & Wheeler, T. T. (2015). Keratin and S100 calcium-binding proteins are major constituents of the bovine teat canal lining. *Veterinary research*, 46(1), 113.
- Sordillo, L. M. (2018). *Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis*. *Veterinary clinics: food Animal Practice*, 34(3), 507-523.
- Tabas, I., & Glass, C. K. (2013). Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*, 339(6116), 166-172.



Capítulo 8

Infección y respuesta de la glándula mamaria bovina

G. Torres^{1,2} Bacteriólogo, MSc, Dr.Sci.

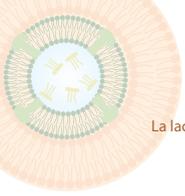
1. Vía y mecanismos de ingreso de los patógenos mamarios

Las bacterias pueden llegar a la piel del pezón de la glándula mamaria a través de las manos del ordeñador, pezoneras, leche o cualquier elemento contaminado con el que tenga contacto. Para ingresar al pezón, la bacteria primero debe sobrepasar las barreras naturales generadas por el esfínter y el tapón de queratina, empleando sus propios mecanis-

1. Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia.

2. Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES.





mos de adhesión y multiplicación que le permiten avanzar por el canal. También puede ingresar ayudada por elementos físicos que la arrastran hacia el interior como las cánulas de aplicación de antibióticos y las diferencias de presión ocasionadas por las fluctuaciones de vacío durante el ordeño mecánico. Una vez la bacteria alcanza el interior del pezón, debe superar la acción expulsiva del ordeño frecuente, por lo que en este punto la capacidad de adherencia al tejido influirá sobre la permanencia dentro del cuarto infectado, evento decisivo en la fase temprana de la patogénesis (Philpot & Nickerson, 2000).

Se ha descrito que las bacterias Gram positivas se adhieren mejor al tejido que las bacterias Gram negativas. *S. aureus* es una de los que mejor se adhiere al tejido interno de la glándula (Philpot & Nickerson, 2000; Foster et al., 2014). Esta capacidad de adherencia se le atribuye a una familia de proteínas conocidas como componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMM), las cuales hacen parte del grupo de proteínas de anclaje a la pared celular (CWA). En *S. aureus* se han identificado alrededor de 28 diferentes CWA y su expresión puede variar entre cepas (genotipo), por condiciones ambientales o necesidades bacterianas.

Las MSCRAMM son proteínas de superficie que median el ataque a componentes extracelulares, tales como fibrinógeno, fibronectina y colágeno; incluso, algunas presentan funciones adicionales a la adhesión (Foster et al., 2014). Las proteínas MSCRAMM más estudiadas en *S. aureus* son las de unión a Fibronectina A y B (FnBPA and FnBPB), porque además de mediar la unión a fibronectina, también están involucradas en los procesos de invasión celular, uno de los factores de virulencia más importantes de esta bacteria (Brouillette et al., 2003; Budd, Mitchell & Keane, 2016).



La fibronectina es una glicoproteína presente en la matriz extracelular y está compuesta por tres módulos estructurales (tipo 1, tipo 2 y tipo 3). Las FnBP de *S. aureus* presentan alta afinidad por el módulo tipo 1, mientras que, el módulo tipo 3 es reconocido por la integrina $\alpha 5\beta 1$, un receptor expresado en la superficie de las CEM (Schwarz-Linek et al., 2003; Foster et al., 2014); en este caso la fibronectina actúa como un puente entre la bacteria y la célula (Fowler et al., 2000) (Figura 1A). Un estudio reciente demostró que la expresión de las FnBP es cepa dependiente y su ausencia en la cepa evaluada redujo la adhesión a las CEM hasta en un 40% y la invasión en un 95%, comparado con la cepa control (Budd et al., 2016).

2. Reconocimiento inicial de la bacteria

El contacto de la bacteria con las células epiteliales del tejido y con las células somáticas (CS) durante su ingreso desencadena la respuesta inicial contra el patógeno. La importancia de las CEM radica en que son inmunocompetentes y son las células con las que inicialmente entra en contacto la bacteria cuando ingresa. Al ser inmunocompetentes, tienen la capacidad de producir mediadores inflamatorios y quimioquinas que desencadenan la activación y migración de leucocitos, principalmente de neutrófilos, CS predominantes durante la fase aguda de la respuesta (Yang et al., 2008; Günther et al., 2009; Bougarn et al., 2010; Günther et al., 2011).

Las CEM, como las CS, pueden reconocer a los microorganismos mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ubicados en la superficie o a nivel intracelular (Figura 1B y 1C). Estos receptores se unen a los Patrones Moleculares Asociados a los Microorganismos (MAMP), estructuras como los lipopolisacáridos (LPS) en las bacterias



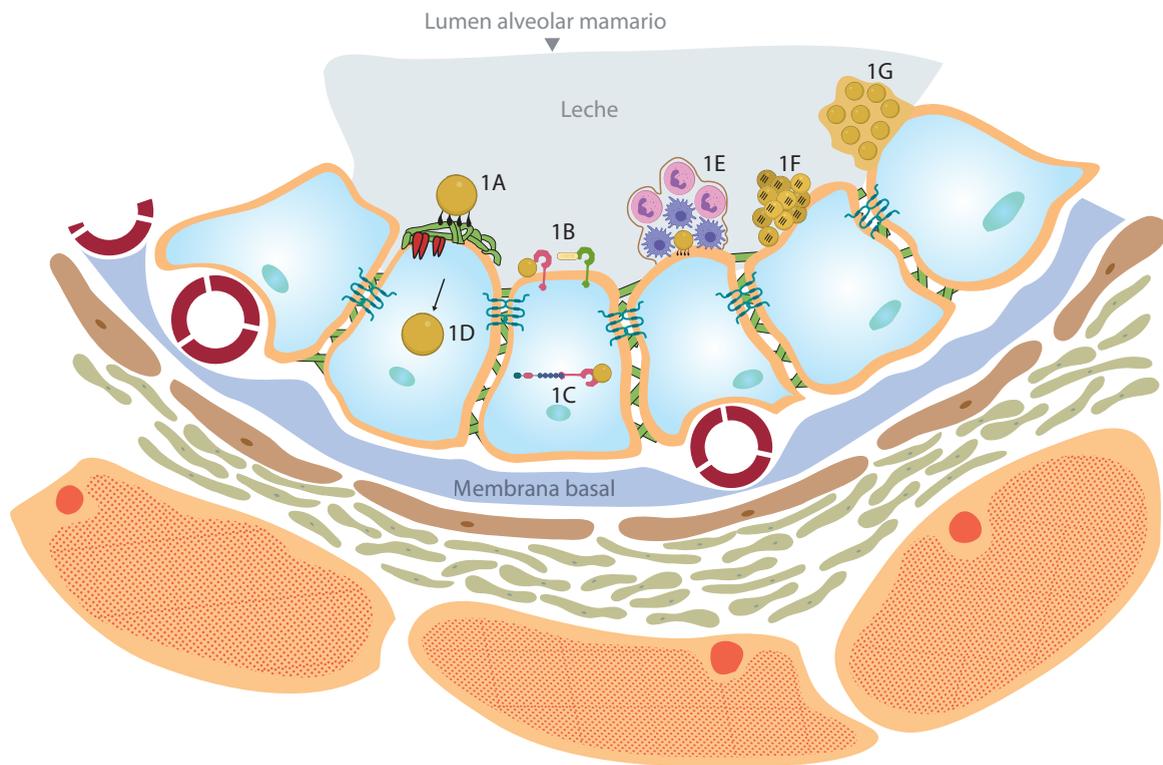


Figura 1. Mecanismos de adhesión, reconocimiento y comportamiento de los patógenos en glándula mamaria. **1A.** Adhesión de *S. aureus* a la fibronectina mediante FnBP y colonización extracelular; **1B** y **1C.** Reconocimiento intra y extracelular de bacterias por medio de TLRs; **1D.** Invasión celular; **1E.** Formación de abscesos; **1F.** Biopelícula independiente de PIA; **1G.** Biopelícula dependiente de PIA.

Fuente: G Torres 2019

Convenciones

	<i>Staphylococcus aureus</i>		CWA		TLR4
	TLR2		$\alpha 5\beta 1$		Fibronectina
	<i>S. aureus</i> PIA independiente - <i>bap</i> +		NLR		<i>S. aureus</i> PIA dependiente - <i>ica</i> +



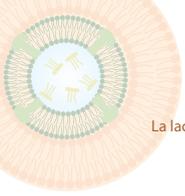
Gram negativas y los ácidos lipoteicoicos (ALT) en las Gram positivas. Los Receptores Tipo Toll (TLR) son una clase de PRRs que reconocen un amplio rango de MAMPs (Bougarn et al., 2010; Abbas et al., 2014). A la fecha se han descrito 13 TLRs en mamíferos; en bovinos solo se reconocen 10 (McGuire et al., 2006; Fu et al., 2013). Generalmente los TLRs son específicos y cada uno tiene la capacidad de unirse a un MAMP. Estudios han demostrado que TLR4 es el receptor responsable del reconocimiento de las bacterias Gram negativas como *E. coli*. En el caso de *S. aureus*, bacteria Gram positiva, el TLR2 es el que se ha asociado a su reconocimiento, debido a que pueden unirse a ALT y al peptidoglicano presentes en la pared bacteriana. El TLR4 no es tan específico, ya que se observó que falló su activación frente a *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis*, bacterias también causantes de mastitis (Farhat et al., 2008; Schukken et al., 2011). El TLR2 también puede reconocer LPS de algunas bacterias Gram negativas (Smith et al., 2003; Park & Lee, 2013).

S. aureus invade eficientemente las células y es reconocido en el citosol por los receptores tipo NOD (NLR), un PRR que interactúa con el peptidoglicano de la pared celular de la bacteria (Abbas et al., 2014; Im et al., 2014; Wang et al., 2015) (Figura 1C).

3. Comportamientos de las bacterias dentro de la glándula mamaria

En el interior de la glándula mamaria las bacterias pueden presentar diferentes comportamientos: permanecer en el ambiente extracelular adheridas a las CEM y secretar las toxinas con las que generan daño al tejido o manipulan el sistema inmune (Figura 1A); invadir las CEM para quedar fuera del alcance de los mecanismos de respuesta inmune o an-





tibióticos (Figura 1D); formar abscesos (quistes), como lo hace *S. aureus* que tiene la capacidad de generar una pseudocápsula a partir de depósitos de fibrina y células inmunes muertas, de manera que evita la entrada de fagocitos y promueve la supervivencia dentro de la lesión (Figura 1E), o generar biopelícula, una conformación bacteriana que le permite evadir la respuesta inmune e incrementar la tolerancia frente a los diferentes agentes antimicrobianos (Figura 1F y 1G). Las biopelículas pueden ser dependientes del polisacárido PIA, sintetizado a partir de la expresión del operón *ica*. Las biopelículas independientes de PIA tienen como base la proteína Bap, la cual es codificada por el gen *bap* (Donlan & Costerton, 2002; Gomes et al., 2016).

Una vez establecida la infección, las bacterias se pueden ubicar a nivel de alvéolos, conductos y cisternas, donde sus productos junto con los de la respuesta inmune pueden afectar la integridad anatómica y funcional de los alvéolos. Esto puede llegar a tal punto que se disminuye la producción de leche por daño en las células secretoras y se altera la barrera hemato-láctea, lo que permite que componentes como cloro, sodio, potasio, hidrógeno, iones hidróxido y sangre se mezclen con la leche (Zhao & Lacasse, 2008; Viguier et al., 2009).

4. Respuesta inmune

La respuesta inmune de la glándula mamaria frente a los microorganismos involucra una serie de acciones coordinadas entre diferentes tipos de células y sus productos. Esta reacción, en algunos casos, finaliza con la eliminación de la infección, pero en otros el patógeno consigue superarla y se genera mastitis persistentes de difícil control. A continuación, se describen los principales mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa con los cuales la glándula mamaria enfrenta a dos de los principales patógenos (Figura 2).



4.1 Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato de la glándula mamaria incluye barreras físicas, tales como el esfínter del pezón y el tapón de queratina; moléculas solubles antimicrobianas como la lactoferrina y defensinas y diferentes tipos de células (CEM, macrófagos, neutrófilos).

4.1.1. Células somáticas

La leche de bovinos sanos presenta normalmente una población residente de células inmunes conocidas como células somáticas (CS). Las células predominantes en este grupo son los macrófagos, pero también contiene neutrófilos, linfocitos y células epiteliales (Tabla 1) (Sordillo, 2005). El recuento normal de CS en un cuarto mamario varía entre 20.000 y 100.000 células/ml (Schukken et al., 2011).

Tabla 1. Porcentaje de cada tipo de célula en leche de bovinos sanos

Macrófagos	Neutrófilos	Linfocitos	CEM	Referencias
35 – 79%	3 – 26%	16 – 28%	2 – 15%	ISO13366-1/IDF148-1 Li et al., 2014
60%	12%	28%	NR	Marino, et al., 2005 Li et al., 2014

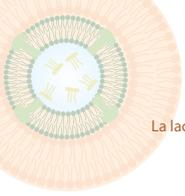
CEM; NR: no reportado

Fuente: elaboración propia

Los macrófagos se consideran la primera línea de defensa celular. Fagocitan y liberan citoquinas y quimioquinas que desencadenan la migración de neutrófilos desde la sangre hasta el sitio de la infección para amplificar la respuesta (Li et al., 2014).

Los neutrófilos, también llamados leucocitos Polimorfonucleares (PMN), son la CS predominantes durante la fase aguda de la respuesta, a tal pun-





to que pueden representar en leche hasta el 92% del Recuento de Células Somáticas (RCS) (Li et al., 2014). Estas células también eliminan a las bacterias invasoras mediante fagocitosis. Diferentes estudios han demostrado la importancia de los neutrófilos en la respuesta frente a las infecciones con *E. coli* (Hill, 1981; Schukken et al., 2011; Herry et al., 2017).

Los linfocitos son un componente de la inmunidad adaptativa y se considera que hacen parte de las CS. Los linfocitos se dividen en dos subpoblaciones: los T (LT), importantes mediadores de la inmunidad celular, y los B, involucrados en la inmunidad humoral (anticuerpos). A su vez, los LT se subdividen en linfocitos CD4+, también conocidos como linfocitos T ayudadores (LTH), y en linfocitos T CD8+, reconocidos por su acción citotóxica (LTC) (Schukken et al., 2011; Abbas et al., 2014). Los LT CD8+ son la población de linfocitos predominante en la glándula mamaria sana (Shafer-Weaver, Pighetti, & Sordillo, 1996; Schukken et al., 2011) y en la fase aguda de las infecciones con *S. aureus* y *E. coli* hay un incremento de los LT CD4+ (Grönlund, Johannisson, & Persson, 2006; Schukken et al., 2011). Los resultados de investigaciones sugirieron que el comportamiento de estas células depende del microorganismo o cepa involucrada en la infección (Schukken et al., 2011; Sordillo, 2005).

The National Mastitis Council (NMC) estableció en el año 2001 que RCS superiores a las 200.000 células/ml de leche obtenida de un cuarto marmario indican una probable infección o que el cuarto se está recuperando de una infección (solo se aprecia si se hace control lechero en forma repetida) (National Mastitis Council, 2001; Petzer et al., 2017b). Un estudio publicado recientemente, donde analizaron 345.467 muestras de leche compuesta y 89.635 muestras de cuarto, confirmó lo establecido por NMC en cuanto al umbral del RCS fijado para detectar infecciones mamarias en el cuarto (≥ 200.000 células/ml) y estableció el umbral del RCS para las muestras compuestas en igual o superior a 150.000 células/ml (Petzer et



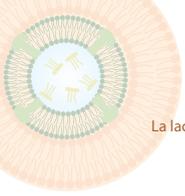
al., 2017a). En otro estudio, donde se validó el RCS como indicador de infecciones intramamarias (IIM) de acuerdo con los principales patógenos, se encontró que su sensibilidad fue del 88,2% en muestras de cuarto y del 84,2% en muestras compuestas; mientras que su especificidad fue baja, 57,7% y 52,8%, respectivamente. Adicionalmente, reportaron que cuando se tiene en cuenta los umbrales descritos anteriormente (≥ 200.000 células/ml en muestra de cuarto y ≥ 150.000 células/ml en muestra compuesta), el 20,5% de los cuartos y el 30,8% de las vacas infectadas con *S. aureus* podrían no ser detectadas por los bajos RCS que se presentan. Incluso, estos porcentajes podrían incrementar a 49 y 69%, respectivamente, si el umbral excede las 500.000 células/ml (Petzer et al., 2017b).

4.2.2. Mecanismos efectores de los fagocitos

Los macrófagos y los neutrófilos pueden reconocer y unirse a los microorganismos directamente, mediante los PRRs (Figura 2A), o indirectamente, por receptores que se unen a las opsoninas (fracción C3a y C5a del complemento o IgG), las cuales se pueden localizar en la superficie de estos (Figura 2B).

El fagocito se adhiere al microorganismo y lo internaliza dentro una vacuola conocida como fagosoma. Esta se fusiona posteriormente con los lisosomas para formar el fagolisosoma, donde finalmente la bacteria es eliminada mediante los diferentes mecanismos microbicidas que intervienen en el proceso, a saber: a) el estallido respiratorio, proceso donde se generan las especies reactivas del oxígeno, moléculas altamente oxidantes; b) la producción de especies reactivas del nitrógeno, especialmente del óxido nítrico o c) la descarga de enzimas proteolíticas dentro del fagolisosoma. Estos mecanismos en conjunto y bajo condiciones normales lesionan al microorganismo hasta su destrucción (Abbas et al., 2014) (Figura 2C).





La rápida y efectiva respuesta de los neutrófilos es clave para la resolución de la infección; sin embargo, en algunos trabajos se ha cuestionado su función fagocítica y bactericida por la ingestión de caseína y glóbulos de grasa que afectan los mecanismos microbicidas dentro del fagolisosoma y la membrana del fagocito (Mehrzaad, Duchateau, & Burvenich, 2005; Thamavongsa et al., 2015). En un trabajo se observó una asociación positiva entre el porcentaje de grasa y el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *S. aureus* aisladas en muestras de leche (Boerhout et al., 2016).

Los neutrófilos, además, usan Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET), también conocido como NETosis, proceso donde la célula libera todo su material nuclear (DNA y proteínas) y el de sus gránulos sobre el microorganismo (Swain et al., 2014) (Figura 2D).

4.2.3. Producción de citoquinas y quimioquinas

Una vez es reconocida la bacteria, se activan los mecanismos moleculares que promueven la expresión de genes que codifican para las principales citoquinas pro-inflamatorias: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1 β (IL-1 β) y la IL-6. La importancia de estas citoquinas dentro del proceso inflamatorio está dada por la capacidad que tienen para preparar a las células endoteliales para que permitan la migración de los leucocitos al sitio de la agresión (ej. TNF- α y la IL-1 β), para promover la fagocitosis en neutrófilos (ej. TNF- α) y estimular la producción de reactantes de fase aguda (ej. IL-1 β e IL-6) (Fu et al., 2013). La activación de los TLRs en condiciones normales desencadena la expresión de los genes que codifican para las citoquinas por la vía dependiente de la proteína adaptadora MyD88 y del factor nuclear κ B (NF- κ B).

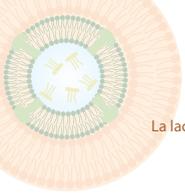
Se ha observado en diferentes estudios que *S. aureus* tiene la capacidad de bloquear o inhibir la activación del NF- κ B y, por consiguiente, alte-



rar la magnitud y tiempo de respuesta, especialmente de las citoquinas TNF- α y la IL-1 β . En otros patógenos, como *E. coli*, sucede lo contrario: se ha descrito una fuerte y rápida respuesta (Yang et al., 2008; Günther et al., 2011; Lara-Zárate et al., 2011). No obstante, algunos autores observaron en las infecciones con *S. aureus* la expresión de estas citoquinas en ausencia del factor, sugiriendo la participación de vías independientes, tales como la proteína de activación 1 (AP-1) y el elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE). En otros casos, lo que se obtuvo fue transcripción de los genes después del reto, pero no hubo traducción (Kim et al., 2011; Bougarn et al., 2010). Recientemente se reportó la presencia de IL-17 en leche de animales infectados con *E. coli*, una interleucina producida por los linfocitos TH17 y con capacidad de estimular la producción de quimioquinas involucradas en la migración de neutrófilos y de incrementar la producción de defensinas (Abbas et al., 2014; Herry et al., 2017; Blum et al., 2017) (Figura 2E).

Simultáneamente a la producción de las citoquinas, se inicia la producción de quimioquinas, importantes moléculas involucradas en la migración de leucocitos (neutrófilos, macrófagos, linfocitos) desde la sangre hasta el sitio de la infección. La palabra quimioquina es una contracción de citoquina quimiotáctica. Estas moléculas cumplen dos funciones importantes en la inflamación: incrementar la adhesión de los leucocitos al endotelio y direccionar la migración de éstos hacia el sitio de la infección (Abbas et al., 2014). La evaluación del transcriptoma de las CEM después de retadas con *E. coli* demostró que este tipo de célula puede expresar la mayoría de las quimioquinas (Günther et al., 2009). Una de las quimioquinas más estudiadas a nivel mamario es la CXCL8 (IL-8) y se ha demostrado su expresión después de la infección con diferentes patógenos tanto en tejido como en la leche (Bannerman, 2009). La eficaz migración de los neutrófilos a la glándula mamaria es consecuencia de





la rápida y abundante producción de la CXCL8 por parte de los macrófagos y las CEM. El gen que codifica para la CXCL8 es uno de los que primero se expresa en las CEM después de un estímulo inflamatorio (Abbas et al., 2014; Schukken et al., 2011) (Figura 2F).

Algunas de las quimioquinas detectadas a niveles significativos en diferentes estudios son: la CCL2 y CCL5, responsables del reclutamiento de leucocitos en general; la CCL20, involucrada en la migración de linfocitos TH17, y la CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL6 y CXCL8 (IL-8), encargadas de la migración de los neutrófilos (Kiku et al., 2016; Rainard et al., 2008; Schukken et al., 2011). En términos generales, lo que ha demostrado la evidencia es que estos factores se expresan a niveles más bajos en *S. aureus* que en *E. coli*. Incluso su expresión puede ser patógeno-específico (Schukken et al., 2011; Günther et al., 2017); por ejemplo, la quimioquina CCL20 se expresa fuertemente en infecciones con *E. coli*, pero no en las infecciones con *S. aureus* (Günther et al., 2017). Esta quimioquina está involucrada en la migración de los linfocitos TH17, un tipo de célula que parece desempeñar un papel importante en las infecciones con este bacilo, dado que desencadena una respuesta para bacterias extracelulares mediada por neutrófilos (Abbas et al., 2014; Herry et al., 2017; Blum et al., 2017).

4.2.4. Producción de péptidos y proteínas antimicrobianas

La producción de péptidos o proteínas con acción antimicrobiana es otro mecanismo de defensa que poseen los leucocitos, así como las células epiteliales, endoteliales y de mucosas (Alva et al., 2012). Unas de las moléculas más estudiadas son las defensinas, pequeños péptidos catiónicos (29 – 34 aminoácidos) que tienen como principal función causar daño directo sobre el microorganismo al alterar su membrana. Se conocen tres familias de defensinas: las α , β y θ ; las β -defensinas son las más estudiadas en mamíferos (Gurao, Kashyap & Singh, 2017). A estas molé-



culas se les ha demostrado su acción frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, virus, hongos y parásitos unicelulares (Brogden, 2005).

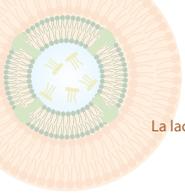
Las defensinas interactúan con la membrana del microorganismo blanco mediante atracción electrostática (péptido catiónico y la membrana aniónica) o a través de receptores presentes en las membranas. Posteriormente, el péptido se inserta en la membrana, de manera que la permeabiliza y ocasiona la lisis del microorganismo por un choque osmótico. Además, se ha reportado que los péptidos antimicrobianos pueden estimular hidrolasas que ayudan a lesionar la pared celular (Gurao et al., 2017) (Figura 2G).

De las 58 β -defensinas que se han predicho *in silico*, solo unas pocas se han estudiado a nivel de glándula mamaria. Diferentes trabajos han demostrado la expresión de algunos genes que codifican para estos péptidos y como respuesta se producen las IIM, las CEM y algunas CS en neutrófilos y macrófagos; estas, a su vez, son las principales fuentes de defensinas en este órgano (Meade et al., 2014; Gurao et al., 2017).

Algunas de las β -defensinas reportadas en glándula mamaria son el péptido antimicrobiano lingual (LAP), el péptido antimicrobiano traqueal (TAP), la β -defensina bovina 1 (DEFB1) —también conocida como β -defensina de neutrófilo bovino 1 (BNBD1)—, la DEFB3 (BNBD3), DEFB4 (BNBD4), DEFB5 (BNBD5), DEFB10 y la DEFB103 (Gurao et al., 2017).

En un estudio en el que se infectó la glándula mamaria de un grupo de vacas con *S. aureus* se evidenció expresión de los genes que codifican para BNBD4 y BNBD5 en cuatro tipo de tejidos (alveolar, ductal, cisterna y del canal), si bien hubo mayor expresión en el tejido alveolar (Whelehan et al., 2011). En otro trabajo donde se retaron células endoteliales bovinas con *S. aureus* y con LPS, se observó expresión de LAP, DEFB1 y





DEFB4, la cual estuvo regulada por la producción autocrina de TNF- α (Murillo et al., 2012). Los resultados obtenidos en una investigación reciente sugieren que los péptidos antimicrobianos no fueron importantes en el control del crecimiento de *E. coli* en leche (Herry et al., 2017).

Al igual que las defensinas, a ciertas proteínas de fase aguda se le ha atribuido acción antimicrobiana. Una de las más importantes en bovinos es el amiloide sérico A (SAA), al que se le ha identificado actividad antibacteriana directa. Esta proteína aumenta significativamente tanto en el suero como en la leche de animales infectados con *S. aureus* (Weber et al., 2006; Eckersall et al., 2006).

Otra de las proteínas solubles de importancia en la respuesta innata es la lactoferrina, una glicoproteína que pertenece a la familia de las transferrinas y que cumple un papel fundamental en la prevención de IIM (Shimazaki & Kawai, 2017). La principal fuente de lactoferrina en la glándula mamaria son las CEM y en menor proporción los leucocitos PMN (Huang et al., 2012). Durante el periodo de no lactancia (periodo seco) se ha detectado altas concentraciones de lactoferrina tanto en la cisterna de la glándula como en la del pezón; durante la lactancia se pueden encontrar fluctuaciones en su concentración (Gurao et al., 2017).

Es bien conocido que la lactoferrina puede tener actividad bacteriostática y bactericida. La quelación del hierro es el principal mecanismo con el que la lactoferrina le causa daño a las bacterias: las desprovee de una molécula fundamental para su desarrollo (Pereyra, Dallard & Calvino, 2014). Además de este mecanismo, la lactoferrina también actúa generando la oclusión de porinas de la superficie bacteriana, la inhibición de formación de biopelículas y la interacción con enzimas líticas como la lisozima. Tal se ha identificado con las citoquinas, la expresión de lactoferrina, así como la sensibilidad o resistencia frente a esta, puede variar



según el patógeno. De acuerdo con algunos resultados de trabajos, se ha observado que la expresión de la lactoferrina en respuesta a las infecciones con *E. coli* es superior a la identificada con *S. aureus* si bien *E. coli* parece mostrar más resistencia a su acción que *S. aureus*, (Wellnitz & Bruckmaier, 2012; Shimazaki & Kawai, 2017).

En contraste con lo anterior, hay reportes acerca del efecto inhibitorio que puede ejercer sobre la respuesta inflamatoria en las mastitis causadas por Gram negativos, debido a la capacidad que tiene esta glicoproteína de unirse al LPS de las bacterias. Se ha sugerido que el complejo lactoferrina-LPS inhibe la activación de los TLR4 al bloquear su interacción con los LPS, lo que puede llevar a la supresión inmune (Latorre et al., 2012; Puddu et al., 2010; Shimazaki & Kawai, 2017).

4.2 Inmunidad adaptativa

Además de los mecanismos efectores de la inmunidad innata con los que la glándula mamaria enfrenta a los microorganismos invasores, también se han descrito componentes de la inmunidad adaptativa durante la respuesta. Los únicos componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y los anticuerpos (Abbas et al., 2014). En contraste con la inmunidad innata, esta respuesta se caracteriza por la especificidad y la capacidad de generar memoria inmunológica. Entender este último mecanismo se ha convertido en un verdadero reto para los investigadores y una limitante para generar vacunas que protejan a la glándula mamaria de infecciones (Schukken et al., 2011).

La evidencia ha demostrado que la inmunidad protectora de la glándula mamaria es de vida corta y generalmente desaparece en semanas (Petzl et al., 2017; Schukken et al., 2011). En humanos se ha observado que dependiendo del tipo de linfocito B (LB) activado —marginal o folicular— y



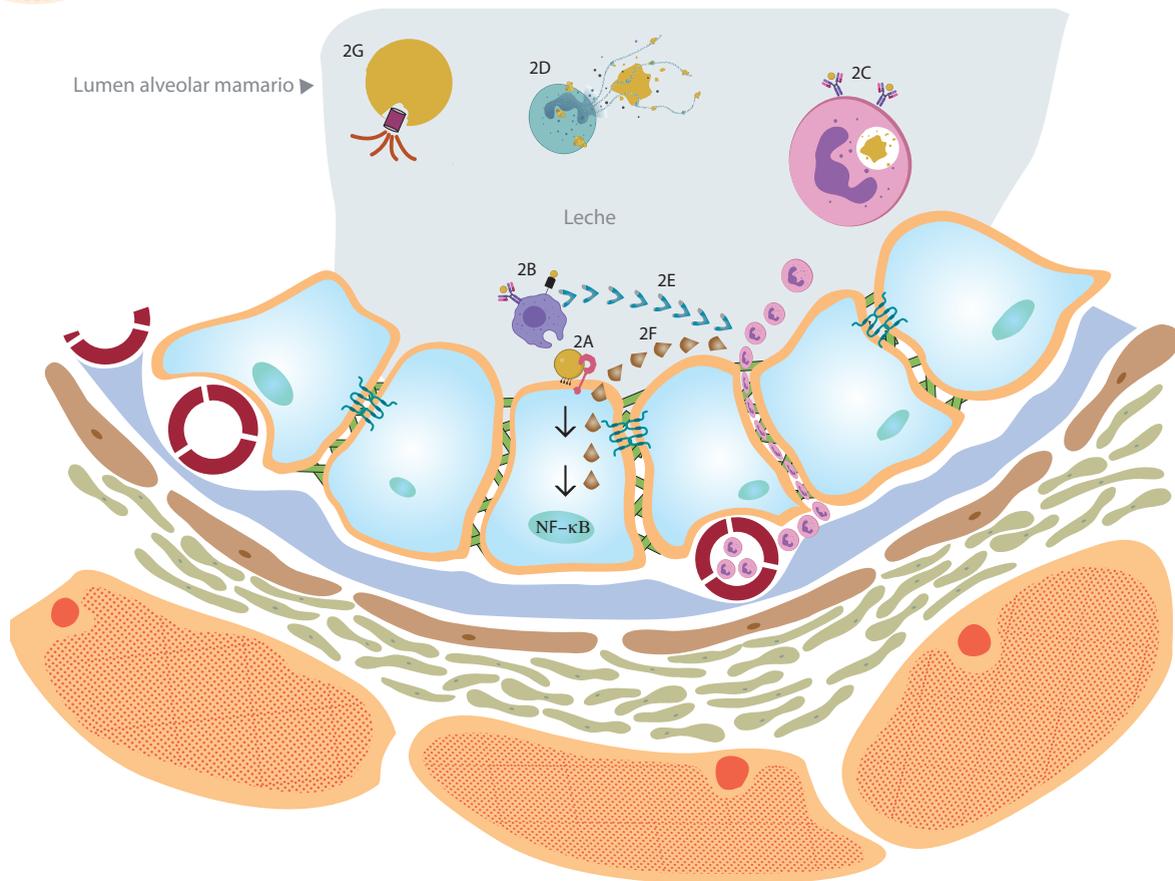


Figura 2. Principales mecanismos de respuesta de la inmunidad innata y adaptativa con los que la glándula mamaria enfrenta las infecciones: **2A.** reconocimiento de la bacteria; **2B.** opsonización por anticuerpos y complemento; **2C.** fagocitosis; **2D** NETosis; **2E** y **F.** producción de citoquinas y quimioquinas; **2G.** péptidos o proteínas antimicrobianas.

Fuente: G Torres 2019

Convenciones

<i>Staphylococcus aureus</i>	CWA	TLR4
TLR2	$\alpha5\beta1$	Fibronectina
<i>S. aureus</i> PIA independiente - <i>bap</i> +	NLR	<i>S. aureus</i> PIA dependiente - <i>ica</i> +

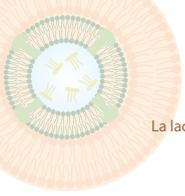


de la naturaleza del Antígeno (Ag) —proteico o lipopolisacáridos (LPS)— se desencadena una respuesta humoral que perdura o no en el tiempo. Si se activan los LB marginales o el Ag es diferente a una proteína, se generarán células plasmáticas (CP) de corta vida que van a producir Anticuerpos (Ac) de baja afinidad; mientras que, si se activan los LB foliculares o el Ag es proteico, se generan CP de larga vida que producirán Ac específicos, los cuales pueden durar por meses o años después del estímulo y permiten reaccionar rápidamente contra el Ag si vuelve a entrar (Abbas et al., 2014).

Los anticuerpos son un componente fundamental de la inmunidad adquirida. Sus funciones son neutralizar, activar el complemento y opsonizar (Abbas et al., 2014). Sin embargo, como algunas bacterias pueden invadir eficientemente las células epiteliales, así como formar biopelículas, cápsulas o quistes intramamarios, se ha propuesto que este tipo de respuesta no es suficiente ni efectiva para enfrentar estas infecciones, pues los microorganismos quedan fuera del alcance de las inmunoglobulinas (Grönlund et al., 2006; Atalla et al., 2010).

La IgG es el isotipo predominante en leche de bovinos sanos, específicamente el subtipo IgG1, que alcanza niveles hasta de 100 veces más altos que la IgG2 (Pastoret, 1998). Las principales funciones de la IgG son opsonizar y activar el complemento, por lo que cumplen un papel importante en la eliminación de los microorganismos mediante fagocitosis (Abbas et al., 2014). En los estudios donde se ha estimulado el sistema inmune de la glándula mamaria mediante diferentes vacunas o inmunógenos, se ha observado el incremento de la IgG1 y de la IgG2 tanto en sangre como en leche (Schukken et al., 2011). El incremento de la IgG2 se ha relacionado con el aumento de los neutrófilos, dado que son estos fagocitos las células con mayor presencia de receptores para la inmunoglobulina (Boerhout et al., 2016; Herry et al., 2017). Incluso algunos reportes muestran que la elimi-





nación de coliformes en glándula mamaria por medio de PMN fue óptima cuando los niveles de IgG2 incrementaron dentro de las cuatro horas posteriores a la IIM, lo cual demuestra la importancia de esta inmunoglobulina en la respuesta frente a ese grupo bacteriano (Schukken et al., 2011).

Se ha sugerido que el aumento de la IgG en leche se debe a una pérdida de la integridad de la barrera hemato-láctea, que permite el paso de las inmunoglobulinas desde la sangre a la leche. (Lehmann, Wellnitz, & Bruckmaier, 2013).

Una de las vacunas para mastitis bovina más comercializada es la que incluye la cepa J5 de *E. coli* y la cepa SP140 de *S. aureus*, ambas inactivadas. Los resultados en los animales infectados con *S. aureus* muestran principalmente una respuesta TH2, caracterizada por el incremento de la IgG1. Con *E. coli*, mediada por una respuesta TH1, se ha observado por el contrario un incremento de la IgG2 (Piepers et al., 2017; Schukken et al., 2011). Además, se ha demostrado con otros inmunógenos que la intensidad de la respuesta puede ser dosis y vía dependiente; por ejemplo, en un estudio donde probaron diferentes vías de inmunización contra *S. aureus* se observó que la mejor vía de aplicación del inmunógeno fue a nivel del ligamento suspensorio, pues se determinó una diferencia en la respuesta y mayores títulos de IgG1 e IgG2 en suero y leche con respecto a las otras vías (intranasal, intramuscular e intramamaria) (Boerhout et al., 2015).

5. Mecanismos de patogenicidad y evasión de la respuesta inmune

5.1 *Escherichia coli*

Las infecciones con *E. coli* generalmente son autolimitadas y controladas por la respuesta inmune; aunque algunas pueden persistir y resultar en



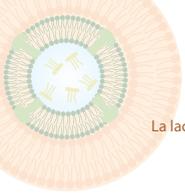
mastitis crónica (Blum, Heller, & Leitner, 2014; Gomes et al., 2016). La severidad de la mastitis generada por este bacilo se le ha atribuido principalmente a factores del animal; no obstante, hay evidencia que demuestra que la severidad o intensidad de la respuesta es cepa dependiente (Blum et al., 2017). Un estudio en el que se compararon a nivel genotípico y fenotípico cuatro cepas de *E. coli*, dos causantes de mastitis aguda (VL2874 y P4), una de mastitis persistente (VL2732) y una aislada del ambiente (K71), se concluyó que las cepas aisladas de mastitis presentan potencial patogénico con respecto a la ambiental. Se encontraron marcadores genómicos asociados a citotoxicidad en las cepas causantes de mastitis aguda; mientras que los asociados a invasión intracelular se identificaron en la cepa responsable de mastitis persistente. A nivel fenotípico se encontró que la cepa persistente fue más versátil en cuanto a metabolismo de nutrientes con respecto a las otras cepas patógenas evaluadas (Blum et al., 2015; Blum et al., 2014; Gomes et al., 2016; Blum et al., 2017).

5.2 *Staphylococcus aureus*

El modelo infeccioso y los factores de virulencia de *S. aureus* han sido más estudiados, por lo que en este punto se hace una descripción más detallada de las estrategias que puede emplear el patógeno para responder y alterar los componentes del sistema inmune mamario.

Las mastitis causadas por *S. aureus* generalmente evolucionan a infecciones crónicas difíciles de erradicar; hecho que se le ha atribuido a la capacidad que posee el patógeno para evadir y manipular la respuesta inmune a través de los múltiples factores de virulencia reportados (Günther et al., 2017). Los mecanismos con los que *S. aureus* enfrenta el sistema inmune de la glándula se pueden dividir en dos categorías: los que le permiten pasar desapercibido frente a los elementos de alarma





y aquellos que le ayudan a escapar o manipular el sistema cuando es reconocido y atacado.

En la primera categoría (Figura 3A), fundamentales para establecer la infección, se pueden incluir los mecanismos de invasión celular, la formación de cápsula y la producción de proteínas tipo superantígeno de los *Staphylococcus* (*Staphylococcal Superantigen-Like* - SSLs). *S. aureus* se ha considerado un microorganismo extracelular; sin embargo, su habilidad de invadir y sobrevivir dentro de varios tipos de células ha sido evidenciada en numerosos estudios (Finlay & Cossart, 1997; Kim et al., 2011). Invadir las células le permite a la bacteria quedar fuera del alcance de mecanismos efectores importantes de la respuesta inmune, tales como la fagocitosis y los anticuerpos. Varios elementos se han relacionado con la capacidad de invasión, entre estos, la expresión de receptores e integrinas, el bloqueo o inactivación de NF- κ B (Figura 3A-1), el fenotipo conocido como colonias pequeñas variantes (Small Colony Variants - SCV) (Figura 3A-2), la presencia de polisacáridos capsulares y la formación de biopelícula. Algunos estudios demostraron que el bloqueo de la integrina $\alpha 5\beta 1$ reduce significativamente la invasión intracelular, al igual que la expresión de la Proteína asociada a la biopelícula (*Biofilm-Associated Protein* – Bap) y la presencia de polisacáridos capsulares (Valle et al., 2012b; Pöhlmann-Dietze et al., 2000; Bardiau et al., 2014). Por el contrario, se ha observado que cuando la bacteria presenta el fenotipo de SCV es más eficiente para ingresar que el fenotipo normal (Atalla et al., 2008) (Figura 3A-2).

Con respecto a la cápsula, se han descrito alrededor de 11 polisacáridos capsulares, el CP5 y el CP8 son los más frecuentes tanto en humanos como en bovinos. Esta estructura le confiere a la célula bacteriana protección frente al reconocimiento y la fagocitosis, debido a que no per-



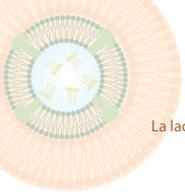
mite la unión de PRRs y opsoninas a sus moléculas blanco (Figura 3A-3). Las SSLs pueden variar entre cepas, sin embargo, la evidencia indica que los genes *ssl1*, *ssl2*, *ssl3*, *ssl11*, *ssl12*, *ssl13*, *ssl14* son frecuentes entre todos los aislados. Uno de los polisacáridos más importantes es el SSL3, dado que puede unirse a los TLR2 expresados en las células epiteliales e inmunes para bloquear el reconocimiento de la bacteria (Yokoyama et al., 2012; Thammavongsa et al., 2015) (Figura 3A-4).

En cuanto a los mecanismos que componen la segunda categoría (Figura 3B), claves para mantener la infección después de reconocida, se pueden dividir en cinco grupos: i) los factores que intervienen con la quimioatracción y migración de neutrófilos; ii) los factores que inhiben el accionar de los neutrófilos y del complemento; iii) los factores de destrucción celular; iv) los factores con los que se aísla del entorno y v) los factores que alteran la inmunidad adaptativa.

i) Factores que intervienen con la quimioatracción y migración de neutrófilos

El *Staphylococcus aureus* puede afectar estos procesos, fundamentales en el control de la infección, a través de la secreción de algunas SSLs o por proteínas inhibitorias de la quimioatracción (*Chemotaxis Inhibitory Protein of S. aureus* - CHIPS). El patógeno puede alterar la generación de las moléculas C3a y C5a del complemento, importantes quimiotácticos de células fagocíticas, al no permitir que se active el sistema fuente de estos componentes. Por ejemplo, la SSL7 y la SSL10 (Figura 3B-1) tienen la capacidad de secuestrar inmunoglobulinas mediante la unión a la fracción Fc para que no puedan activar el complemento por la vía clásica o puede bloquear las tres vías al inactivar directamente los factores C3 y C5 (Thammavongsa et al., 2015). En caso que se activen las vías del complemento y se produzca el quimioatrayente C5a, la bacteria





puede bloquear su función mediante las CHIPS (Figura 3B-2) (Postma et al., 2004). La adhesión al endotelio y migración de los neutrófilos puede ser alterada por la SSL5 y la SSL11, quienes se adhieren a la glicoproteína PSGL-1, presente en las membranas de los fagocitos, y no permiten su unión con la P-selectina, molécula expresada en el endotelio del huésped y clave para la adhesión y posterior migración de los leucocitos al sitio de la infección (Bestebroer et al., 2007).

ii) Factores que inhiben el accionar de los neutrófilos y del complemento

La sola fagocitosis de *S. aureus* no garantiza su eliminación, pues la bacteria posee varias estrategias con las que puede alterar los mecanismos efectores de este proceso (Figura 3B-3). Frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno, emplea elementos antioxidantes, tales como el pigmento estafiloxantina y la catalasa; mientras que contra el superóxido utiliza las superóxido dismutasas (SodA and SodM) (Liu et al., 2005; Cosgrove et al., 2007; Karavolos et al., 2003). La bacteria produce flavohemoglobina y Lactato deshidrogenasa como respuesta al óxido nítrico. Incluso puede inhibir la desgranulación al incrementar la concentración extracelular de Adenosina mediante la enzima catalítica de superficie Adenosin sintetasa A (AdsA). La Adenosina producida se une a su receptor en la membrana del fagocito y desencadena una cascada de señalización anti-inflamatoria que bloquea la liberación de los gránulos dentro del fagosoma (Thammavongsa et al., 2009). Otra de las estrategias es modificar químicamente el peptidoglicano (acetilación) para generar resistencia frente a la lisozima y péptidos antimicrobianos (Bera et al., 2005). Con respecto a las NET, esta bacteria las evade mediante DNasas, enzimas que le permiten degradar este material antes de que sufra daño (Thammavongsa et al., 2013) (Figura 3B-4).



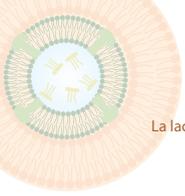
Además de la SSL7 y el SSL10, descritas anteriormente, *S. aureus* presenta otros mecanismos con los que también puede afectar el sistema del complemento. La Aureolisina (Aur), una metaloproteasa dependiente de Zinc y secretada por la bacteria, puede degradar el factor C3, por lo que no se van a generar las fracciones encargadas de la quimioatracción (C3a y C5a), la opsonización (C3b y C5b) y el complejo de ataque a la membrana, objetivo final de este sistema (Laarman et al., 2011) (Figura 3B-5). Otra manera de afectar dicho sistema es inhibiendo la C3 convertasa (C3c) por medio del inhibidor del complemento (SCIN) que en condiciones normales es la responsable de fragmentar C3 en C3a y C3b dos productos claves en el proceso. Sin embargo, al igual que con la Aur, el mecanismo de *S. aureus* bloquea todo lo que dependa de la activación y correcto funcionamiento de estas moléculas (Rooijackers et al., 2005) (Figura 3B-6).

La destrucción de diferentes tipos de células inmunes está mediada básicamente por toxinas, especialmente, por las β -toxinas formadoras de poro (β -PFTs) (Figura 3B-7). Las más representativas de este grupo son la α -Hemolisina (Hla) y las leucocidinas. Todas las cepas pueden producir al menos tres leucocidinas (Luk): γ -Hemolisina AB (HlgAB), HlgCB y la Leucocidina AB (LukAB); mientras que la producción de la LukED es cepa dependiente. La Hla forma un anillo heptamérico y las Luk uno octamérico que contienen un poro central, con el cual debilitan la membrana de la células blanco hasta causarles lisis osmótica (Heuck et al., 2001; Miles et al., 2002).

iii) Factores que la aíslan y protegen del entorno

La formación de biopelícula y de abscesos son los principales representantes de este grupo (Figura 3B-8). La biopelícula es considerada un factor de virulencia que le confiere ventajas a los patógenos causantes de mastitis, debido a que les facilita su persistencia en glándula mamaria. De hecho, diferentes autores en los últimos años se han interesado en





la formación de biopelícula, pues esta estructura le permite a la bacteria evadir la respuesta inmune e incrementar la tolerancia frente a los diferentes agentes antimicrobianos, por lo que estas infecciones serán más difíciles de eliminar (Gomes et al., 2016). Se ha descrito que alrededor del 40% de las mastitis corresponden a casos que no resolvieron con los tratamientos antibióticos aplicados (Hillerton & Kliem, 2002). Cuando las bacterias forman biopelícula pueden tolerar 10 veces o más la concentración de antibióticos requerida para eliminarla en condiciones normales y tampoco son accesibles a la opsonización y fagocitosis, procesos que son fundamentales para la eliminación de las infecciones mamarias (Donlan & Costerton, 2002; Gomes et al., 2016).

Las biopelículas son ampliamente definidas como un grupo de células inmersas en una matriz que estas mismas forman. La formación de biopelícula es un proceso dinámico e inicia con la adhesión de la bacteria a la superficie viva, que en este caso serían las CEM, mediante las diferentes proteínas de superficie descritas. Posteriormente, las bacterias se multiplican y forman varias capas de células. Al tiempo en que estas se multiplican, se van generando los componentes que conforman la matriz en la cual quedarán inmersas las células bacterianas y demás material proveniente del medio ambiente. Además, durante la formación de la biopelícula se crean en su interior canales por donde van a fluir elementos indispensables para la supervivencia de las bacterias, tales como el oxígeno, metabolitos y nutrientes. Conformada la biopelícula, las bacterias allí contenidas generan una ruptura de la estructura mediante enzimas líticas para poder liberarse y colonizar otras áreas (Gomes et al., 2016; McCarthy et al., 2015).

El *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos más aislados de las IIM a nivel mundial y una de las bacterias con mayor capacidad de formar

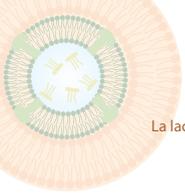


biopelícula sobre superficies vivas e inertes (Keefe, 2012; Gomes et al., 2016). Esta bacteria puede formar dos tipos de biopelículas: una donde la matriz tiene como base el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) y la otra a base de proteínas. La primera es conocida como dependiente de PIA y codificada por el operón *ica*; la segunda es conocida como independiente de PIA, codificada por gen *bap* y asociada también a la meticilino resistencia (McCarthy et al., 2015).

Entre los mecanismos de formación de biopelícula el más estudiado ha sido el dependiente de PIA. En este se produce básicamente el polisacárido poli-N-acetilglucosamina (PNAG), también conocido como PIA, el cual es codificado por el operón *ica*. El operón está compuesto por cinco genes: cuatro (A, D, B, C) codifican para las proteínas involucradas en la biosíntesis y exportación de PIA a la superficie de la pared bacteriana, el quinto (R) codifica para un regulador transcripcional. Las proteínas codificadas por los genes *icaA*, *icaD* e *icaC* corresponden a proteínas transmembrana. La proteína producto del gen *icaA* tiene actividad glicosiltransferasa y es la responsable de la síntesis del polisacárido; en este proceso también interviene el producto del gen *icaD*. Inmediatamente el polisacárido alcanza un tamaño máximo de 20 residuos, el producto derivado del gen *icaC* lo transloca a la superficie celular; sin embargo, para que el polisacárido formado se desprenda de la bacteria y quede totalmente sobre su superficie, este debe ser deacetilado por el producto del gen *icaB* (O’Gara, 2007). El PIA formado queda con una carga neta positiva que promueve la agregación intercelular y la unión de la bacteria a la superficie inerte (Rohde et al., 2010). La mayoría de las cepas de importancia clínica son portadoras del operón *ica* (Fowler et al., 2001; Cucarella et al., 2004).

Uno de los primeros reportes de formación de biopelícula independiente de PIA en *S. aureus* fue realizado precisamente en un aislado de





mastitis bovina, en el cual se identificó Bap (Cucarella et al., 2001). Esta proteína tiene un tamaño de 2.276 aminoácidos y permite la unión a las superficies y la adhesión intercelular.

Bap es codificada por el gen *bap*, el cual hace parte de un transposón que se inserta en la isla de patogenicidad SaPI_{bov2}; su inserción incluso reemplaza algunos genes que codifican para toxinas (Cucarella et al., 2004). La evidencia sugiere que el gen *bap* se puede transmitir entre cepas mediante transferencia horizontal de genes (Tormo et al., 2005). A la fecha, el gen *bap* solo se ha encontrado en cepas aisladas de bovinos y su frecuencia entre las cepas puede variar por regiones o países. Un estudio demostró que cuando las cepas portan este genotipo son menos invasivas, debido a que Bap bloquea la interacción de las FnBP con su ligando (fibronectina), proceso fundamental para que la bacteria pueda ingresar a la CEM (Cucarella et al., 2002; Valle et al., 2012b).

Otro de los mecanismos que se ha relacionado con la formación de biopelícula independiente de PIA es la Meticilino resistencia en *S. aureus* (McCarthy et al., 2015). Algunos estudios han mostrado que las cepas resistentes a la Meticilina expresan el fenotipo proteico; las cepas sensibles presentan el fenotipo PIA dependiente (McCarthy et al., 2015). Se ha demostrado que en cepas de *S. aureus* Meticilino resistentes el operón *ica* puede estar presente y expresado, pero el PIA no se produce (O'Neill et al., 2007). El operón *ica* en estos casos puede estar reprimido más de 300 veces en comparación con las cepas Meticilino sensibles, lo que conlleva a la formación de una biopelícula a base de proteínas.

Por otra parte, los abscesos son comunidades bacterianas que se protegen dentro de una pseudocápsula formada a base de depósitos de fibrina y rodeada de capas de células inmunes muertas. Esta estructura evita la entrada de fagocitos y promueve la supervivencia dentro de la lesión.

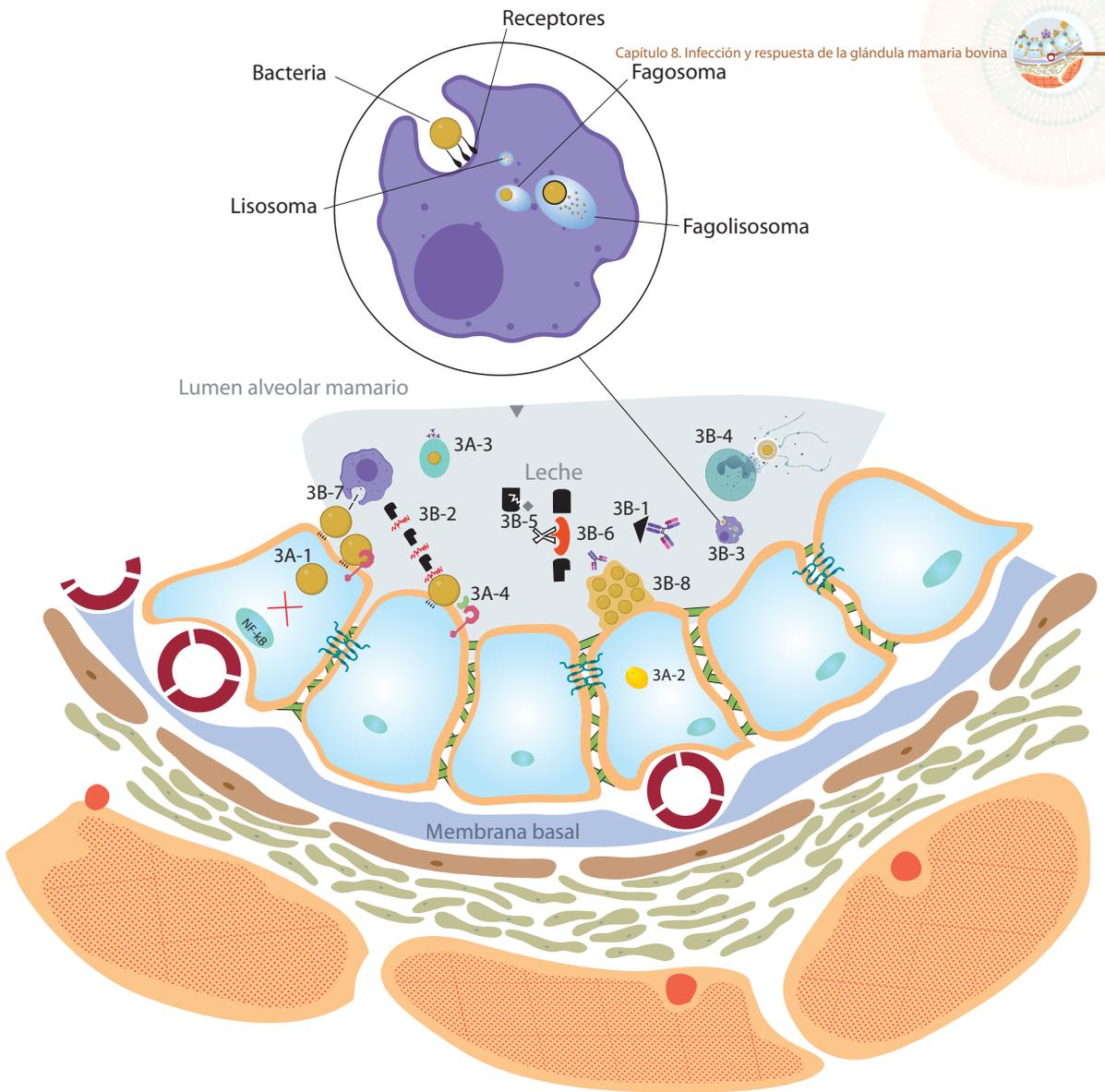


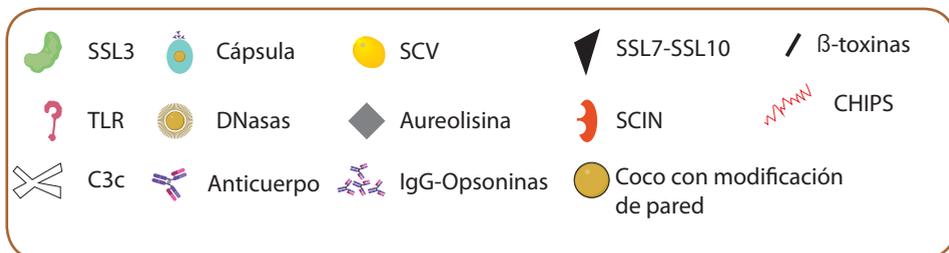
Figura 3. 3A. Mecanismos que emplean las bacterias para evadir o retrasar su reconocimiento por parte del sistema inmune: invasión celular (**3A-1**); fenotipo SCV (**3A-2**); presencia de cápsula (**3A-3**); producción de SSLs (**3A-4**). **3B.** Mecanismos con los cuales las bacterias evaden o manipulan la respuesta inmune desencadenada después de reconocidas: alteración de la quimioatracción y migración de los neutrófilos (**3B-1** y **3B-2**); inhibición de la fagocitosis y del complemento (**3B-3**, **3B-4**, **3B-5** y **3B-6**); destrucción de células (**3B-7**); aislamiento del entorno (biopelículas) (**3B-8**).

Fuente: G Torres 2019





Convenciones



Su formación está mediada por la Deoxiadenosina generada durante la degradación de las NET a través de nucleasas secretadas por la bacteria. Esta Deoxiadenosina desencadena la apoptosis de los macrófagos que rodean al patógeno, por lo que las células muertas terminan aislándola de su entorno (Thammavongsa et al., 2013).

iv) Factores que alteran la inmunidad adaptativa

El *Staphylococcus aureus* también puede interferir con los mecanismos efectoros de la inmunidad adaptativa. En este proceso participan básicamente superantígenos y la Proteína A (SpA). SpA, expresada y secretada por todas las cepas de interés clínico, tiene la capacidad de unirse tanto a la fracción Fc como a la fracción Fab de las inmunoglobulinas. De acuerdo a la evidencia, cuando se une a la fracción Fab de la IgM de superficie de los Linfocitos B desencadena apoptosis, mientras que, cuando sucede en los plasmoblastos, el resultado es la producción de anticuerpos no específicos debido a que altera la hipermutación somática (Goodyear & Silverman, 2004; Thammavongsa et al., 2015). Por otra parte, la respuesta de los LT también se ve afectada por superantígenos. En este caso, los superantígenos interfieren entre las células presentadoras de antígenos y los LT ayudadores, pues se unen a los receptores involucrados en esta, al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II) y a los receptores de las

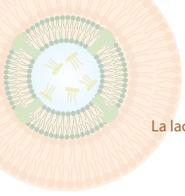


células T (TCR), lo que desencadena una respuesta no específica para el patógeno (Jardetzky et al., 1994; Thammavongsa et al., 2015).

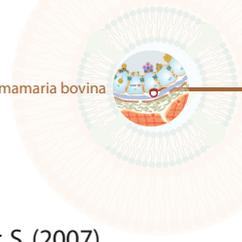
Bibliografía

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology* (Eighth). Elsevier.
- Alva, N., Téllez, A., Sagrero, E., López, J., & Ochoa, A. (2012). Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells. *Cellular Immunology*, *280*(1), 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.016>
- Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C., Moisan, H., Malouin, F., & Mallard, B. (2008). Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathogens and Disease*, *5*(6), 785-799. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0110>
- Atalla, H., Wilkie, B., Gyles, C., Leslie, K., Mutharia, L., & Mallard, B. (2010). Antibody and cell-mediated immune responses to *Staphylococcus aureus* small colony variants and their parental strains associated with bovine mastitis. *Developmental and Comparative Immunology*, *34*(12), 1283-1290. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.07.005>
- Bannerman, D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science*, *87*(13 Suppl), 10-25. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1187>
- Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J., & Ote, I. (2014). Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, *169*(1-2), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.010>
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., & Götz, F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, *55*(3), 778-787. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x>
- Bestebroer, J., Poppelier, M., Ulfman, L., Lenting, P., Denis, C., van Kessel, K., de Haas, C. (2007). Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood*, *109*(7), 2936-2943. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-015461>



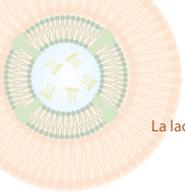


- Blum, S., Heller, E., Jacoby, S., Krifucks, O., & Leitner, G. (2017). Comparison of the immune responses associated with experimental bovine mastitis caused by different strains of *Escherichia coli*. *The Journal of Dairy Research*, 84(2), 190-197. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000206>
- Blum, S., Heller, E., & Leitner, G. (2014). Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 201(1), 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.008>
- Blum, S., Heller, E., Sela, S., Elad, D., Edery, N., & Leitner, G. (2015). Genomic and Phenomic Study of Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 10(9), e0136387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136387>
- Boerhout, E., Koets, A., Vernooij, J., Mols-Vorstermans, T., Nuijten, P., Rutten, V., Eisenberg, S. (2016). Reisolation of *Staphylococcus aureus* from bovine milk following experimental inoculation is influenced by fat percentage and specific immunoglobulin G1 titer in milk. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4259-4269. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10648>
- Boerhout, E., Vrieling, M., Benedictus, L., Daemen, I., Ravesloot, L., Rutten, V., Eisenberg, S. (2015). Immunization routes in cattle impact the levels and neutralizing capacity of antibodies induced against *S. aureus* immune evasion proteins. *Veterinary Research*, 46, 115. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0243-7>
- Bougarn, S., Cunha, P., Harmache, A., Fromageau, A., Gilbert, F., & Rainard, P. (2010). Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 17(11), 1797-1809. <https://doi.org/10.1128/CVI.00268-10>
- Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238-250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P., & Talbot, B. (2003). In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microbial Pathogenesis*, 35(4), 159-168.
- Budd, K., Mitchell, J., & Keane, O. (2016). Lineage associated expression of virulence traits in bovine-adapted *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 189, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.013>



- Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J., Mond, J., & Foster, S. (2007). Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 1025-1035. <https://doi.org/10.1128/JB.01524-06>
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2888-2896. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001>
- Cucarella, C., Tormo, M., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, I., Foster, T., & Penadés, J. (2002). Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and Immunity*, 70(6), 3180-3186.
- Cucarella, C., Tormo, M., Ubeda, C., Trotonda, M., Monzón, M., Peris, C., Penadés, J. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 72(4), 2177-2185.
- Donlan, R., & Costerton, J. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Eckersall, P., Young, F., Nolan, A., Knight, C., McComb, C., Waterston, M., Fitzpatrick, J. (2006). Acute Phase Proteins in Bovine Milk in an Experimental Model of *Staphylococcus aureus* Subclinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1488-1501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72216-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72216-0)
- Farhat, K., Sauter, K., Brcic, M., Frey, J., Ulmer, A., & Jungi, T. (2008). The response of HEK293 cells transfected with bovine TLR2 to established pathogen-associated molecular patterns and to bacteria causing mastitis in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125(3-4), 326-336. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.05.026>
- Finlay, B., & Cossart, P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5313), 718-725.
- Foster, T., Geoghegan, J., Ganesh, V., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Fowler, T., Wann, E., Joh, D., Johansson, S., Foster, T., & Höök, M. (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell $\beta 1$ integrins. *European Journal of Cell Biology*, 79(10), 672-679. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00104>



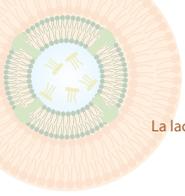


- Fowler, V., Fey, P., Reller, L., Chamis, A., Corey, G., & Rupp, M. (2001). The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Medical Microbiology and Immunology*, 189(3), 127-131. <https://doi.org/10.1007/s430-001-8018-5>
- Fu, Y., Zhou, E., Liu, Z., Li, F., Liang, D., Liu, B., Yang, Z. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 155(4), 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.08.003>
- Gomes, F., Saavedra, M., & Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease*, 74(3). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>
- Goodyear, C., & Silverman, G. (2004). Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11392-11397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404382101>
- Grönlund, U., Johannisson, A., & Persson Waller, K. (2006). Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 80(2), 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.002>
- Günther, J., Esch, K., Poschadel, N., Petzl, W., Zerbe, H., Mitterhuemer, S., Seyfert, H. (2011). Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity*, 79(2), 695-707. <https://doi.org/10.1128/IAI.01071-10>
- Günther, J., Koczan, D., Yang, W., Nürnberg, G., Reipsilber, D., Schuberth, H., Seyfert, H. (2009). Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Veterinary Research*, 40(4), 31. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009014>
- Günther, J., Petzl, W., Bauer, I., Ponsuksili, S., Zerbe, H., Schuberth, H., Seyfert, H. (2017). Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Scientific Reports*, 7(1), 4811. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05107-4>



- Gurao, A., Kashyap, S., & Singh, R. (2017). β -defensins: An innate defense for bovine mastitis. *Veterinary World*, *10*(8), 990-998. <https://doi.org/10.14202/vet-world.2017.990-998>
- Herry, V., Gitton, C., Tabouret, G., Répérant, M., Forge, L., Tasca, C., Rainard, P. (2017). Local immunization impacts the response of dairy cows to *Escherichia coli mastitis*. *Scientific Reports*, *7*(1), 3441. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03724-7>
- Heuck, A., Tweten, R., & Johnson, A. (2001). Beta-barrel pore-forming toxins: intriguing dimorphic proteins. *Biochemistry*, *40*(31), 9065-9073.
- Hill, A. W. (1981). Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Research in Veterinary Science*, *31*(1), 107-112.
- Hillerton, J., & Kliem, K. (2002). Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *Journal of Dairy Science*, *85*(4), 1009-1014. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74161-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74161-1)
- Huang, Y., Morimoto, K., Hosoda, K., Yoshimura, Y., & Isobe, N. (2012). Differential immunolocalization between lingual antimicrobial peptide and lactoferrin in mammary gland of dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *145*(1-2), 499-504. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.10.017>
- Im, J., Lee, T., Jeon, J., Baik, J., Kim, K., Kang, S., Han, S. (2014). Gene expression profiling of bovine mammary gland epithelial cells stimulated with lipoteichoic acid plus peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*. *International Immunopharmacology*, *21*(1), 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.05.002>
- Jardetzky, T., Brown, J., Gorga, J., Stern, L., Urban, R., Chi, Y., Wiley, D. (1994). Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, *368*(6473), 711-718. <https://doi.org/10.1038/368711a0>
- Karavolos, M., Horsburgh, M., Ingham, E., & Foster, S. (2003). Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* (Reading, England), *149*(Pt 10), 2749-2758. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26353-0>
- Keefe, G. (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *28*(2), 203-216. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>
- Kiku, Y., Nagasawa, Y., Tanabe, F., Sugawara, K., Watababe, A., Hata, E., Hayashi, T. (2016). The cell wall component lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* induces chemokine gene expression in bovine mammary epithelial cells. *The Journal of*



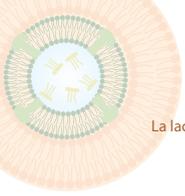


- Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0706>
- Kim, K., Im, J., Jeon, J., Lee, H., Yun, C., & Han, S. (2011). *Staphylococcus aureus* induces IL-1 β expression through the activation of MAP kinases and AP-1, CRE and NF- κ B transcription factors in the bovine mammary gland epithelial cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(4), 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.04.004>
- Kim, Y., Atalla, H., Mallard, B., Robert, C., & Karrow, N. (2011). Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research*, 7, 51. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-51>
- Laarman, A., Ruyken, M., Malone, C., van Strijp, J., Horswill, A., & Rooijackers, S. (2011). *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 186(11), 6445-6453. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002948>
- Lara, L., López, J., & Ochoa, A. (2011). *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 51(5), 313-318. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.07.010>
- Latorre, D., Berlutti, F., Valenti, P., Gessani, S., & Puddu, P. (2012). LF immunomodulatory strategies: mastering bacterial endotoxin. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 90(3), 269-278. <https://doi.org/10.1139/o11-059>
- Lehmann, M., Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. (2013). Concomitant lipopolysaccharide-induced transfer of blood-derived components including immunoglobulins into milk. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 889-896. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5410>
- Li, N., Richoux, R., Boutinaud, M., Martin, P., & Gagnaire, V. (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Science & Technology*, 94(6), 517-538. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0176-3>
- Liu, G., Essex, A., Buchanan, J., Datta, V., Hoffman, H., Bastian, J., Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(2), 209-215. <https://doi.org/10.1084/jem.20050846>
- Marino, R., Considine, T., Sevi, A., McSweeney, P., & Kelly, A. (2005). Contribution of proteolytic activity associated with somatic cells in milk to cheese ripening. *International Dairy Journal*, 15(10), 1026-1033. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.10.006>



- McCarthy, H., Rudkin, J., Black, N., Gallagher, L., O'Neill, E., & O'Gara, J. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00001>
- McGuire, K., Jones, M., Werling, D., Williams, J., Glass, E., & Jann, O. (2006). Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal Genetics*, 37(1), 47-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01364.x>
- Meade, K., Cormican, P., Narciandi, F., Lloyd, A., & O'Farrelly, C. (2014). Bovine β -defensin gene family: opportunities to improve animal health? *Physiological Genomics*, 46(1), 17-28. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00085.2013>
- Mehrzad, J., Duchateau, L., & Burvenich, C. (2005). High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Veterinary Research*, 36(1), 101-116. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004055>
- Miles, G., Movileanu, L., & Bayley, H. (2002). Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 11(4), 894-902. <https://doi.org/10.1110/ps.4360102>
- National Mastitis Council. (2001). Guidelines on normal and abnormal raw milk based on SCC and signs of clinical mastitis.
- O'Gara, J. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), 179-188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D., & O'Gara, J. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), 1379-1388. <https://doi.org/10.1128/JCM.02280-06>
- Park, B., & Lee, J. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, 45, e66. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
- Pastoret, P. (1998). Handbook invertebrate immunology. USA: Academic Press.
- Pereyra, E., Dallard, B., & Calvinho, L. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 363-375. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70096-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70096-3)



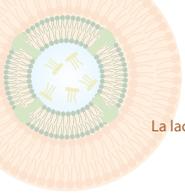


- Petzer, I., Karzis, J., Donkin, E., Webb, E., & Etter, E. (2017a). Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 84(1), e1-e10.
- Petzer, I., Karzis, J., Donkin, E., Webb, E., & Etter, E. (2017b). Validity of somatic cell count as indicator of pathogen-specific intramammary infections. *Journal of the South African Veterinary Association*, 88(0), e1-e10.
- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Seyfert, H., Hussien, J., & Schuberth, H. (2017). Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Research in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.012>
- Philpot, N., & Nickerson, S. (2000). Ganando la lucha contra la mastitis (Vol. 1). Westfalia.
- Piepers, S., Prenafeta, A., Verbeke, J., De Visscher, A., March, R., & De Vlieghe, S. (2017). Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 769-782. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11269>
- Pöhlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K., Döring, G., Lee, J., Fournier, J., Wolz, C. (2000). Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infection and Immunity*, 68(9), 4865-4871.
- Postma, B., Poppelier, M., van Galen, J., Prossnitz, E., van Strijp, J., de Haas, C., & van Kessel, K. (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(11), 6994-7001.
- Pozzi, C., Waters, E., Rudkin, J., Schaeffer, C., Lohan, A., Tong, P., O'Gara, J. (2012). Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002626>
- Puddu, P., Latorre, D., Valenti, P., & Gessani, S. (2010). Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 23(3), 387-397. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9307-3>
- Rainard, P., Fromageau, A., Cunha, P., & Gilbert, F. (2008). *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 39(5), 52. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008034>



- Rohde, H., Frankenberger, S., Zähringer, U., & Mack, D. (2010). Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology*, 89(1), 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.10.005>
- Rooijackers, S., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M., Presanis, J., Sim, R., van Strijp, J. (2005). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nature Immunology*, 6(9), 920-927. <https://doi.org/10.1038/ni1235>
- Schukken, Y., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M., Goetze, L., Holst, O., Seyfert, H. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4), 270-289. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.022>
- Schwarz-Linek, U., Werner, J., Pickford, A., Gurusiddappa, S., Kim, J., Pilka, E., Potts, J. (2003). Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature*, 423(6936), 177-181. <https://doi.org/10.1038/nature01589>
- Shafer-Weaver, K., Pighetti, G., & Sordillo, L. (1996). Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 212(3), 271-280.
- Shimazaki, K., & Kawai, K. (2017). Advances in lactoferrin research concerning bovine mastitis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 95(1), 69-75. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0044>
- Smith, M., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A., Ryan, K., Goldberg, J. (2003). Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR5, but Not TLR4, Are Required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B Activation and Chemokine Expression by Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 32552-32560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305536200>
- Sordillo, L. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, 98(1), 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.017>
- Swain, D., Kushwah, M., Kaur, M., Patbandha, T., Mohanty, A., & Dang, A. (2014). Formation of NET, phagocytic activity, surface architecture, apoptosis and expression of toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) in neutrophils of mastitic cows. *Veterinary Research Communications*, 38(3), 209-219. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9606-1>





- Thammavongsa, V., Kern, J., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2009). *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(11), 2417-2427. <https://doi.org/10.1084/jem.20090097>
- Thammavongsa, V., Kim, H., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(9), 529-543. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3521>
- Thammavongsa, V., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2013). *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6160), 863-866. <https://doi.org/10.1126/science.1242255>
- Tormo, M., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., & Penadés, J. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 7), 2465-2475. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27865-0>
- Valle, J., Latasa, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano, C., Penadés, J., & Lasa, I. (2012a). Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002843. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002843>
- Viguié, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27(8), 486-493. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>
- Wang, H., Yu, G., Yu, H., Gu, M., Zhang, J., Meng, X., Li, J. (2015). Characterization of TLR2, NOD2, and related cytokines in mammary glands infected by *Staphylococcus aureus* in a rat model. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57, 25. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0116-0>
- Weber, A., Weber, A. T., McDonald, T. L., & Larson, M. (2006). *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells: Implications for early diagnosis of mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2), 79-83. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.023>
- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 192(2), 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>



- Whelehan, C., Meade, K., Eckersall, P., Young, F., & O'Farrelly, C. (2011). Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140(3-4), 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.11.013>
- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R., Günther, J., Draing, C., Seyfert, H. (2008). Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology*, 45(5), 1385-1397. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.004>
- Yokoyama, R., Itoh, S., Kamoshida, G., Takii, T., Fujii, S., Tsuji, T., & Onozaki, K. (2012). Staphylococcal superantigen-like protein 3 binds to the Toll-like receptor 2 extracellular domain and inhibits cytokine production induced by *Staphylococcus aureus*, cell wall component, or lipopeptides in murine macrophages. *Infection and Immunity*, 80(8), 2816-2825. <https://doi.org/10.1128/IAI.00399-12>
- Zhao, X., & Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*, 86(13 Suppl), 57-65. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0302>



¿Cómo se desarrolla la glándula?, ¿cómo empieza la producción de calostro y la secreción de leche?, ¿cómo entra en latencia la glándula y posteriormente reinicia el ciclo lactogénico?, ¿cómo se relaciona la glándula con el medio externo y en particular con los microorganismos potencialmente patógenos? A través del curso de posgrado “Fisiología de la Lactancia” y ahora con este libro, el grupo de investigación Biogénesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia ha estado contribuyendo a responder a estas y otras preguntas relacionadas con el funcionamiento celular y molecular de la glándula mamaria, que es parte del sistema reproductivo y elemento fundamental de la industria láctea.

Este libro pretende llenar una necesidad sentida de la comunidad académica nacional, así como contribuir a la educación continua de médicos veterinarios y zootecnistas, particularmente en aspectos patológicos y productivos.