

MECANISMOS DE DEFENSA E INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN LA VACA LECHERA

Montoya García, N¹., Acosta Dibarrat, J.P¹., Bedolla Cedeño, C²., Castañeda Vázquez, H³., Cal Pereyra, L⁴., Velázquez Ordoñez, V^{1*}

RESUMEN

La respuesta inmune contra los agentes infecciosos involucra una compleja interacción entre diferentes tipos de células y sus productos, que culmina con la eliminación del agente infeccioso o la muerte del animal. La glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa, que forman parte de la inmunidad innata y de la inmunidad específica. Durante las primeras etapas de la infección se activan los mecanismos inespecíficos de defensa en caso de ser sobrepasados los mecanismos de inmunidad específica se activan con el fin de controlar al patógeno y crear memoria inmunológica la que resultará en un ataque rápido en una segunda exposición al patógeno. Por otra parte la inmunidad se produce por la interacción de los agentes infecciosos y los mecanismos inmunes, durante la infección o mediante la administración de las vacunas se desarrolla la inmunidad local y sistémica. A su vez las células somáticas de la leche que representan una proporción normal de células epiteliales y leucocitos, son consideradas un indicador de la respuesta celular inducida por la inflamación de la glándula mamaria al producirse la agresión. El conocimiento de los

¹ Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, FMVZ-UAEM. FMVZ-Universidad Autónoma

² FMVZ-Universidad Autónoma Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

³ Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias U de G.

⁴ FV Universidad de la República, Uruguay. Red de Cuerpos Académicos en Salud Animal e Inocuidad Alimentaria: México-Uruguay

* Autor de correspondencia: vvo@uaemex.mx

mecanismos inmunes y la resistencia a la enfermedad, son fundamentales para el desarrollo de estrategias de prevención y control de la mastitis, para mejorar la salud de la glándula mamaria en el hato lechero. Por último se discute la implicación del estrés calórico en la ocurrencia de mastitis.

Palabras clave: Glándula mamaria, inmunidad, células somáticas

ABSTRACT

The immune response against infectious agents involves a complex interaction between different types of cells and their products, culminating with the elimination of the infectious agent or the death of the animal. The mammary gland is protected by a variety of defense mechanisms, as part of innate immunity and specific immunity. During the early stages of infection nonspecific defense mechanisms are activated in case of being overwhelmed specific immunity mechanisms are activated to control the pathogen and create immune memory resulting in a fast attack in a second exposure to the pathogen. Moreover immunity produced by the interaction of infectious agents and immune mechanisms, or during infection by administering vaccines local and systemic immunity develops. In turn the milk somatic cells representing a normal proportion of epithelial cells and leukocytes, are considered an indicator of induced inflammation of the mammary gland to aggression cellular response occur. Knowledge of immune mechanisms and disease resistance are fundamental to the development of strategies for prevention and control of mastitis, to improve the health of the mammary gland in the dairy herd. Finally, the implication of caloric stress in the occurrence of mastitis is discussed.

Key words: Mammary gland, immunity, somatic cells

INTRODUCCIÓN

En la vaca lechera la resistencia natural a la infección de la glándula mamaria asociada a la inmunidad innata, es ejercida a través de las barreras físicas, celulares y químicas de la ubre. A su vez la inmunidad específica o adaptativa se desarrolla al interaccionar los agentes infecciosos y los mecanismos inmunes en la inmunidad celular y humoral. La manifestación del desarrollo de la inmunidad local y sistémica se manifiesta en el estado inmune. El sistema inmune es capaz de distinguir lo propio de lo ajeno y reaccionar selectivamente sólo a los antígenos extraños unidos a proteínas de membrana genéticamente diversas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) lo que da diversidad en la presentación de los antígenos bacterianos por los diferentes individuos. Una respuesta inmune específica sólo se producirá si los antígenos se combinan con una molécula de MHC en la superficie de ciertas células, un proceso conocido como presentación antigénica (Sordillo y Streicher, 2002). La incidencia de la mastitis aumenta cuando los mecanismos de defensa de la glándula mamaria están deteriorados. El ganado lechero está expuesto a una serie de presiones genéticas, fisiológicas y ambientales que pueden comprometer el sistema inmune aumentar la incidencia de mastitis. A este respecto el énfasis en la selección genética para maximizar la producción de leche ha aumentado las tensiones metabólicas asociadas con la síntesis y la secreción de leche, existiendo una correlación negativa entre la capacidad de producción de leche y la resistencia a la mastitis (Sordillo y Streicher, 2002). El conocimiento de los mecanismos inmunes y la resistencia es fundamental en la prevención de la mastitis y su contribución en la salud de la glándula mamaria.

BARRERAS DE DEFENSA NATURAL E INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA

En la vaca lechera el tejido glandular mamario es de tipo lóbulo alveolar y de origen ectodérmico. El tejido glandular se encuentra inmerso en el estroma conjuntivo finalmente recubierto por la piel. El tejido glandular se encuentra constituido por tubos ramificados que se comunican con los alvéolos o acinos característicos del parénquima glandular secretor. A su vez el sistema inmune de la ubre

es necesario en la resistencia y defensa de la ubre ejercidas a través de la inmunidad innata y adaptativa. El desarrollo de la inmunidad adaptativa es estimulada de forma específica al ser expuesta la glándula mamaria a los agentes causales de la mastitis e inducida por los inmunógenos se logra un estado de inmunidad necesaria para mejorar la capacidad de defensa y resistencia frente a la mastitis. Por su parte la línea de defensa fagocitaria ejercida por los neutrófilos y macrófagos, complementada por las barreras naturales y los factores solubles químicos presentes en la leche contribuyen a la resistencia natural a la enfermedad. (Zhao y Lacasse, 2008).

La piel de la ubre

La ubre en la vaca lechera está cubierta de una capa de piel delgada y suave; la piel es considerada como la primera barrera de defensa anatómica, impermeable debida a la acción de la queratina presente en el estrato corneo, que evita la penetración y pérdida de agua a través de los estratos inferiores de la piel. La humectación cutánea es necesaria para brindar la textura, suavidad, elasticidad y flexibilidad, consideradas características deseables en la piel. Al disminuir su humedad la elasticidad de la piel se pierde y resquebraja produciendo fisuras de la queratina, con formaciones de nódulos. La presencia de pequeños surcos sobre la piel sugiere alteraciones en la secreción de ácidos grasos libres y el ácido láctico que afectan el pH y el equilibrio de la microflora, propiciando la colonización de patógenos sobre la piel. Las abrasiones y soluciones de continuidad de la piel son frecuentemente una fuente de infección cutánea por *Staphylococcus aureus* y *Arcanobacterium pyogenes* (Waage *et al.*, 1999).

El meato y canal del pezón

En el pezón inserto en el cuarto glandular mamario, el meato está presente en su porción distal; estructuralmente se integra por un conjunto de fibras de musculo liso circundantes al orificio del pezón, las cuales mantienen el tono muscular y el cierre del meato en las vacas después del ordeño. El canal del meato en su estructura interna mide aproximadamente de 2 a 4 mm, presentando su borde recubierto de queratina, la cual se mantiene íntegra debido a la secreción de ácidos grasos entre ellos, los ácidos mirístico y palmi-

to-oleico, esteárico y oleico, además de las proteínas catiónicas de la queratina. Los elementos en conjunto mantienen íntegra la barrera física y química del meato ejerciendo un efecto bacteriostático y bactericida sobre las bacterias que colonizan el meato (Capucco *et al.*, 1990). A su vez la elasticidad del pezón contribuye a mantener cerrado el canal del meato limitando el ingreso de patógenos al conducto galactóforo y cisterna de la leche; la cisterna normalmente es mantenida libre de patógenos en la ubre sana (Rosemberg *et al.*, 2003; Philpot, 1994).

En los primeros días del periodo seco de la vaca, la queratina del meato cambia su estructura y composición para formar un tapón denso que mantiene cerrado el meato hasta el momento del parto. Al permeabilizarse el meato por la pérdida del tapón de queratina antes del parto aumenta el riesgo de infección intramamaria durante el periodo seco y el posparto (Capucco *et al.*, 1992).

Estructuralmente el canal del pezón, comunica al meato con la cisterna de la leche del cuarto glandular mamario. La longitud y el grosor del canal, dependen de factores anatómicos. Los animales de mayor edad tienden a mostrar un canal dilatado, el cual favorece el desarrollo de infecciones en el periodo seco y el inicio de lactancia (Nickerson, 1989). El cierre del canal se mantiene por el meato y las fibras de musculo, que recubren su trayecto, además de las estructuras que conforman el pezón (Zecconi *et al.*, 2000).

Al concluir el ordeño, el cierre completo del meato puede demorar varios minutos. Las malas prácticas de ordeño y las fluctuaciones de vacío del equipo aumentan el riesgo de infección intramamaria y lesiones localizadas; eversión y fisura del meato y eversión de la Roseta de Furstenberg. Estas alteraciones afectan la estructura del meato y su canal, favoreciendo la colonización e infección del pezón (Niellen *et al.*, 1995).

El diámetro del pezón se relaciona con el tamaño del meato y su elasticidad, el cual también se ve afectado por la edad y el fenotipo. Durante el periodo seco y la lactancia, el diámetro del canal del pezón se modifica. En el periodo seco el pezón es menos elástico facilitando el cierre del canal del pezón y el tapón de queratina bloquea el meato protegiendo a la ubre del ingreso potencial de patógenos. Al aumentar la presión de fluidos en la ubre y el flujo de

la secreción glandular mamaria de la vaca se puede perder el tapón de queratina y su efecto de barrera en el meato del pezón (Oliver y Sordillo, 1988).

En la lactancia el pezón es más elástico, facilitando su apertura al momento del ordeño, provocando que las células somáticas acumuladas al final del pezón sean removidas al ser eliminados los primeros chorros de leche al iniciar el ordeño. El manejo en el ordeño mecánico afecta la salud de la glándula mamaria, un aumento en las pulsaciones de la máquina de ordeño puede reducir la cantidad de queratina del canal del pezón e incrementar el conteo de células somáticas (CCS) (Capuco *et al.*, 1994). Al ocurrir la infección por *S. aureus* en la glándula mamaria, se producen cambios de la estructura tisular; hiperplasia, estratificación y queratinización de la cisterna de la leche y reducción del lumen glandular. Estos cambios son provocados por la reacción inflamatoria y la infiltración leucocitaria local del tejido glandular, la cual origina la formación de placas de detritus celulares y queratina, ultraestructuralmente presentes como material amorfo (Nickerson *et al.*, 1995).

En el meato del pezón la queratina constituye una barrera natural, que reduce la colonización bacteriana y limita el desarrollo potencial de infección glandular mamaria (Capuco *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1992). Al producirse la mastitis la composición química de la queratina cambia, se incrementa la proporción de ácidos grasos poliinsaturados y disminuye el contenido de ácidos grasos de cadena corta (Miller *et al.*, 1992). Al ser removida experimentalmente la queratina del canal del pezón, aumenta la tasa de infección por *Streptococcus agalactiae*, consecuentemente se produce una elevada excreción de bacterias en leche y un CCS elevado. Estos hallazgos remarcan la importancia de la queratina como una barrera natural que contribuye a reducir la infección glandular mamaria (Capuco *et al.*, 1992).

Inhibidores bacterianos solubles en leche

Los inhibidores químicos endógenos secretados en la leche, son compuestos que forman parte de las defensas no-inmunológicas de la glándula mamaria, consideradas barreras químicas. Entre ellos se identifican a la lactoferrina y la lactoperoxidasa; estos inhibidores

se encuentran disponible en niveles marginales en la leche, su efectividad sobre la actividad bacteriana se ve afectada por la etapa de lactancia, en función de las concentraciones del citrato presente en el fluido. La actividad inhibidora de estos compuestos en la leche, es relativamente eficaz sobre algunas bacterias como *E. coli* y *S. aureus*, ejerciendo una acción bacteriostática y bactericida que limita la proliferación bacteriana en la leche.

La lactoferrina, producida por los fagocitos y las células epiteliales de la glándula mamaria, se genera al fijarse el hierro en presencia de bicarbonato. Esta proteína inhibe el crecimiento bacteriano e induce la lisis de las bacterias susceptibles (Persson *et al.*, 1992). Diversos estudios indican que la lactoferrina varía en su concentración dependiendo de la etapa fisiológica de la glándula, siendo menor su concentración relativa durante la lactancia que en el periodo seco. Sin embargo cuando ocurre la inflamación de la glándula mamaria las concentraciones de lactoferrina en el tejido glandular se incrementan significativamente, favoreciendo la capacidad de fagocitosis y la actividad bactericida de los neutrófilos (Senft y Neudecker, 1991; Kai *et al.*, 2002). Durante el periodo seco ocurre un fenómeno similar en la glándula mamaria (Rodríguez-Franco, *et al.*, 2005).

El sistema lactoperoxidasa en leche, es un mecanismo dependiente del tiocianato (SCN⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), al generar hipotiocianato (OSCN⁻). Se considera que el peróxido es producido en bajas concentraciones por el epitelio mamario (Sandholm y Koschones, 1995) debido a la baja tensión de oxígeno en la glándula mamaria. El principal efecto de la lactoperoxidasa en la leche es la actividad bactericida, que puede persistir durante algunas horas si la leche se mantiene fría (Reiter, 1985). Por otra parte la mieloperoxidasa presente en la leche tiene una importancia menor en su actividad bactericida. La enzima es producida a partir de los neutrófilos activados y liberada tras ocurrir la apoptosis de los mismos. La mieloperoxidasa de los neutrófilos, se activa al desencadenarse la peroxidación a través de la explosión respiratoria durante la fagocitosis en la glándula mamaria, mostrando su actividad bactericida (Paape *et al.*, 2003).

La lizosima presente en los gránulos azurófilos y secundarios de los neutrófilos tiene acción bactericida sobre las bacterias Gram positivas, sin embargo, se presenta en baja concentración gránulos azurófilos de los neutrófilos bovinos. (Mehzard *et al.*, 2010).

El sistema de complemento

El complemento se constituye por proteínas generadas por una cascada de reacciones similares a las de las enzimas, sin perder su actividad en cada etapa. El complemento tiene como principal función la opsonización de las bacterias, la quimiotaxis leucocitaria y la actividad citotóxica a través del complejo de ataque de membranas (MAC). De este conjunto de proteínas, destacan en su acción, las fracciones: C3b relacionada con la opsonización de las bacterias, C5a con la quimiotaxis de los neutrófilos, C5b-9 con el complejo de ataque de membranas, (MAC) y lisis de bacterias (Rainard, 2003). En la glándula mamaria de la vaca lechera, las concentraciones de las proteínas del complemento varían dependiendo de su etapa fisiológica. Al parto, en el calostro, las concentraciones son relativamente altas y al continuar la lactación sus concentraciones bajan rápidamente (Riollet *et al.*, 2000).

Las inmunoglobulinas en leche

En la glándula mamaria se han identificado los siguientes isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas: IgG (IgG₁, IgG₂), IgM, IgA e IgE. Las mismas tienen un origen clonal en la glándula mamaria y también provienen del aporte de sangre. La IgA es producida en gran parte en la glándula mamaria al igual que la IgM. La IgG muestra concentraciones elevadas en la leche y el calostro, el subtipo IgG₁ es el predominante sobre IgG₂ durante la lactancia. Los acinis glandulares tienen receptores para IgG₁ e IgG₂, los cuales incrementan su afinidad en las últimas semanas del periodo seco relacionada con la producción de calostro. Dentro de estas inmunoglobulinas destaca la actividad de la IgA en la protección local de la glándula mamaria en sus mucosas por su acción neutralizante, la actividad opsonizante de la IgG particularmente de IgG₂ en la fagocitosis y la IgM como activadora del complemento (Worku *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2006).

La resistencia de la glándula mamaria a la infección por *S. aureus* también se ha relacionado con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I del bovino (BoLA); el alelo W3 produjo niveles elevados de anticuerpos del isotipo IgG₁ en respuesta a la infección. Los alelos W4, W7 y W26 a su vez mostraron niveles bajos de IgG₁ en leche y suero sanguíneo, comparados con el alelo CA42 que mostró un incremento al riesgo de sufrir la infección por *S. aureus* en glándula mamaria (Dekkers *et al.*, 1994; Odegard *et al.*, 2003).

La inflamación de la glándula mamaria en la vaca lechera, constituye un mecanismo de resistencia natural a la infección en el desarrollo de la mastitis, caracterizada por el aumento en el CCS y alteraciones físico- químicas presentes en la leche. La severidad de la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria puede variar por el tipo de agente presente en la infección (Todhunter *et al.*, 1995). Diversos autores coinciden en señalar que el CCS está influido directamente por el nivel de infección del hato, la edad de la vaca, la etapa de lactación y la época del año, así como por las condiciones de estrés de producción a que se encuentra sometida la vaca (Harmon, 1994; Schutz *et al.*, 1994; Sol *et al.*, 1994).

CÉLULAS SOMÁTICAS DE LA LECHE

La mastitis bovina limita la expresión del potencial genético de las vacas lecheras, al disminuir la producción láctea y afectar la calidad sanitaria y nutricional de la leche. La mastitis provoca la inflamación del tejido glandular e incrementa el número de células somáticas; asociada a los cambios físicos, químicos y celulares (Kelly *et al.*, 1998; Auld *et al.*, 1995). Las células somáticas de la leche se estiman por CCS como el número total de células/mL de leche. Al ocurrir la infección e inflamación del tejido glandular, el número de células somáticas se ve incrementado por la migración leucocitaria de la sangre a la glándula mamaria (Velázquez-Ordoñez *et al.*, 2005).

Las células somáticas, se describen como la proporción de leucocitos y células epiteliales de la glándula mamaria presentes en la leche. Las células epiteliales representan una pequeña proporción, entre el 3 y 15 % del total celular de la leche, la cual varía en su proporción dependiendo de la etapa de producción de la vaca (Paape

et al., 1991). En las vacas sanas la proporción de células somáticas es $< 1 \times 10^5$ células/mL de leche, conteniendo una proporción decreciente de macrófagos, neutrófilos y linfocitos (Concha *et al.* 1978; Lee *et al.*, 1980).

La proporción de leucocitos en las células somáticas puede variar por el periodo de producción y la salud de la glándula mamaria; los neutrófilos por lo general se ven incrementados en el último tercio de lactación, después de las primeras semanas del periodo seco declinan considerablemente para aumentar nuevamente antes del parto y durante las primeras semanas de la lactación. En el periodo seco; los macrófagos y linfocitos son predominantes en la secreción glandular mamaria. Al parto y durante las primeras semanas de lactación varía la proporción celular de linfocitos, macrófagos y neutrófilos relacionados con las condiciones de salud de la glándula mamaria y la involución uterina.

La deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina (BLAD) es una enfermedad del ganado caracterizada por infecciones recurrentes debido a que los neutrófilos bovinos tienen anomalías en la expresión del complejo glicoproteína Mac-1 (CD11b/CD18) ocasionadas por mutaciones puntuales dentro del alelo que codifica CD18 en el bovino. Durante un proceso infeccioso, los leucocitos usan receptores para adherirse al endotelio vascular y atravesar la pared vascular para llegar al tejido infectado. La mutación asociada al BLAD modifica el receptor de los leucocitos teniendo repercusiones en las propiedades quimiotácticas y fagocitarias de los neutrófilos inhibiendo la respuesta inmune innata (Gerardi, 1996; Acckermann *et al.*, 1996; Nagahata, 2004).

A presentarse la infección de la glándula mamaria el número de células somáticas aumenta en las primeras horas al inicio de la infección, dependiendo de su severidad y del agente presente en la glándula mamaria (Leither *et al.*, 2000). Al persistir la infección, aumenta considerablemente el número de células somáticas tanto en la mastitis subclínica como en la clínica (Hass *et al.*, 2004). Un número elevado de células somáticas en la leche reduce la productividad de las vacas, al incrementar los costos individuales de producción y la disminución de la curva de lactancia. Se estima que la producción total de leche se reduce entre 0.7 y 9 % rela-

cionada con una ligera elevación del número de células somáticas. Las pérdidas mayores se producen con conteos celulares elevados. Contrastando con la presentación de la mastitis clínica que provoca pérdidas entre el 40 y 60 % del volumen total de leche. El control de la mastitis subclínica del hato mejora la eficiencia productiva hasta un 35 % dependiendo de su prevalencia, comparada con el desecho de vacas con infección crónica el cual solamente mejora la productividad entre el 4.9 y 7.4 % (Allore *et al.*, 1995).

Para evaluar el estado de salud de la glándula mamaria, el número de células somáticas de la leche y la actividad enzimática de la NAGase (N-acetyl- β -D-glucosaminidase) son sugeridos como los mejores estimadores para definir el estatus sanitario de la glándula mamaria en el hato para obtener diferencias entre el valor observado y el predecible en el hato infectado (Berning y Shook, 1992).

Al evaluar las células somáticas en las vacas lactantes, los leucocitos polimorfonucleares predominan en la leche. Estos constituyen la primera barrera de defensa celular de la glándula mamaria frente a la infección intraglandular. Sin embargo, un conteo celular elevado de células somáticas tiene un impacto negativo sobre la producción láctea y la calidad de la leche (Kehrli y Shuster, 1994).

La modulación de la actividad fagocitaria de los leucocitos en la glándula mamaria, se ha visto mejorada por diferentes sustancias y fármacos, entre los que destacan selenio, cobre, vitamina A y E. Se ha postulado que las citoquinas naturales y recombinantes tienen una condición relevante como modificadores de la respuesta celular a la fagocitosis de los neutrófilos y macrófagos (Xin *et al.*, 1991; Hogan *et al.*, 1993, Weiss *et al.*, 1997; Gengelbach y Spears, 1998).

POBLACIONES DE LEUCOCITOS EN LA LECHE

Los leucocitos están representados por poblaciones de neutrófilos, macrófagos y linfocitos suspendidos en la leche mediando la respuesta inmune innata y adaptativa en la glándula mamaria. Al ocurrir la inflamación durante la infección en la mastitis (Sordillo *et al.*, 1997; Wellnitz *et al.*, 2012) los diferentes grupos de leucocitos presentes son:

Neutrófilos

Los neutrófilos son el principal tipo celular presente durante la infección de la glándula mamaria (Kimura *et al.*, 2008). En la fagocitosis la actividad bactericida de los neutrófilos se produce por la liberación de radicales oxidantes e hidroxilo principalmente; adicionalmente son liberados péptidos antimicrobianos y defensinas (Papee *et al.*, 2002; Rinaldi *et al.*, 2006; Rinaldi *et al.*, 2007).

En la membrana celular los neutrófilos presentan antígenos de superficie como CD14 y CD18 (Sohn *et al.*, 2007). En el caso del CD14 actúa en la recepción del complejo del lipopolisacárido (LPS) bacterias Gram negativas y de la proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) participando en la respuesta innata contra este grupo de bacterias. Con respecto al antígeno de superficie CD18 se trata de una integrina de la familia β que interviene en los procesos de adhesión celular y transducción de señales, en el caso CD62 L se trata de una L-selectina que también interviene en la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales facilitando su captura en los sitios de inflamación. Se ha observado en vacas al parto que los neutrófilos tienen una actividad reducida en la expresión de las moléculas de adhesión como CD18 o CD62 L similar a la que ocurre cuando las vacas son tratadas con dexametasona al parto, afectándose la defensa celular durante el periodo posparto (Landmann *et al.*, 1991; Van Oostvedt *et al.*, 2002).

Al parto la actividad funcional de los neutrófilos se encuentra disminuida al mostrar una menor actividad de fagocitosis, se ve reducida la producción de aniones superóxido y la capacidad de migración leucocitaria. Esta última función se afecta por una cantidad menor de receptores presentes en la membrana celular para L-selectina (CD62L), encargados de la adherencia leucocitaria en el endotelio vascular y de la migración de los neutrófilos al sitio de inflamación (Diez-Fraile *et al.*, 2004). Es posible que en las semanas posteriores al parto, una reducción del número de neutrófilos en la leche aumente la susceptibilidad a la glándula mamaria para la infección mamaria.

Los fagocitos estimulados expresan las proteínas de adhesión llamadas selectinas e integrinas para favorecer la migración leucocitaria frente al estímulo quimio táctico. En la resistencia de la

glándula mamaria, los neutrófilos, son considerados la primera línea de defensa celular al limitar, reducir y destruir primordialmente a los agentes bacterianos, a través de la liberación de radicales oxidantes y de grupos hidroxilo, las enzimas lisosima y perforina, los péptidos antimicrobianos y las defensinas, son mecanismos que en su conjunto eliminan o limitan la infección bacteriana en la ubre (Paape *et al.*, 2003).

El ciclo celular de los neutrófilos, su producción, activación y destrucción en los tejidos es de corta duración; se estima que en las vacas es menor a cinco días, una vez liberados de la medula ósea al torrente sanguíneo para migrar a los tejidos permanecen cerca de 15 a 20 horas y en la glándula mamaria entre 24 a 48 horas. Posteriormente sufren apoptosis en condiciones normales, sin embargo al fagocitar bacterias patógenas presentes en los tejidos afectados, los neutrófilos son dañados por las toxinas y otros productos tóxicos en el medio produciendo su necrosis. Los neutrófilos destruidos son reconocidos y fagocitados por los macrófagos, modulando la respuesta inflamatoria inducida por la liberación de enzimas leucocitarias y otros productos tóxicos al tejido glandular mamario (Prump *et al.*, 1997).

La extracción de la leche al ordeño y por el amamantamiento, propician la migración leucocitaria intraepitelial al alvéolo glandular mamario para mantener la proporción de neutrófilos en las células somáticas de la leche y su población de leucocitos en el tejido glandular. Por otra parte la actividad de fagocitosis de los neutrófilos en las vacas lecheras puede ser considerada un indicador resistencia a la mastitis, asociado a los parámetros de selección genética en el hato (Velázquez *et al.*, 2008):

En la leche los neutrófilos son las células predominantes en el número total de células somáticas (Vangroenweghe *et al.*, 2002). Aunque la proporción de neutrófilos en la glándula mamaria durante la lactancia es menor, estimada en $<1 \times 10^5$ células/mL de leche. Cuando ocurre la infección bacteriana aumenta considerablemente el número de neutrófilos en leche. En contraste durante el periodo seco su número disminuye, para incrementarse nuevamente cerca del parto y en la primera etapa de la curva de lactación mostrando una actividad mayor en esta etapa.

Los neutrófilos aislados de la glándula mamaria tienen menor capacidad de fagocitosis y acción bactericida, que las células de la sangre (Velázquez *et al.*, 2008). Al ser ordeñadas las vacas remueven los neutrófilos maduros de la leche, los cuales son reemplazados rápidamente por una migración leucocitaria de la sangre a la leche en las siguientes horas.

La baja actividad de fagocitosis mostrada por los neutrófilos de la leche, se asocia a una disminución de la reserva energética, que contribuye a la muerte programada, a través de la activación del sistema de las caspasas endógenas. De la misma manera los neutrófilos al ingresar al lumen alveolar, fagocitan numerosas partículas presentes en la leche, que reducen su actividad bactericida (Reinitz *et al.*, 1982).

MACRÓFAGOS

Los macrófagos son las células fagocitarias responsables del desarrollo de los mecanismos inmunes locales en la glándula mamaria (Sladek *et al.*, 2006) al fagocitar los patógenos y presentar los antígenos a los linfocitos para el desarrollo de la inmunidad humoral y celular (Politis *et al.*, 1992). Los macrófagos al posparto reducen su capacidad fagocítica al disminuir IgM, baja expresión de MHCII. En la glándula mamaria, al igual que en otros tejidos, derivan de los monocitos circulantes en sangre. Al ser estimulados los macrófagos migran al acino glandular debido al estímulo quimiotáctico, al iniciarse el proceso inflamatorio por la infección. Se ha observado que la población de macrófagos en la glándula mamaria permanece constante durante la lactancia y en el periodo seco su población aumenta, a diferencia de los neutrófilos, los cuales disminuyen considerablemente en las primeras semanas del secado. La concentración de macrófagos en la secreción glandular mamaria aumenta considerablemente al término de la gestación, sin embargo la actividad de fagocitosis se encuentra disminuida al parto, al disminuir la expresión del MHC II, situación que afecta la interacción de los macrófagos y linfocitos, consecuentemente reduce temporalmente el desarrollo de la inmunidad adaptativa durante este periodo de lactancia (Fitzpatrick *et al.*, 1992).

Linfocitos

En la glándula mamaria cuenta en mayor proporción con linfocitos T cuyo TCR (receptor de linfocito T) está conformado por el heterodímero $\alpha\beta$ que a la vez se asocian con las moléculas CD4 y CD8 para dar origen a los linfocitos LTCD4 cooperadores y de memoria y los LTCD8 citotóxicos y supresores. A través de su TCR los LTCD4 son capaces de reconocer antígenos asociados con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II presentes en las células presentadoras de antígenos (APC) macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. En el caso de LTCD8 a través de su TCR son capaces de reconocer péptidos antigénicos de microorganismos patógenos asociados al MHC clase I de las células del organismo infectadas desencadenando su acción citotóxica. El primer contacto que ocurre entre el LTCD4 y la célula presentadora de antígenos determinará la orientación de la respuesta inmune hacia el tipo celular Th1 caracterizada por la activación de los LTCD8 y su actividad citotóxica o bien una respuesta de tipo humoral Th2 relacionada con la activación de linfocitos B su transformación en células plasmáticas y en la producción de anticuerpos (Brown *et al.*, 1998). La otra población de linfocitos T presentes en la glándula mamaria son los que poseen en su TCR el heterodímero $\gamma\delta$ que muestran actividad citotóxica y de reparación de los epitelios, su importancia en la glándula mamaria de las vacas no se ha esclarecido totalmente. Se ha observado que durante la reacción inflamatoria los linfocitos CD4 son predominantes mientras que en vacas sanas el fenotipo predominante es CD8 (Riollet *et al.*, 2000).

Las Linfocitos NK, no expresan CD3 marcador universal para los linfocitos T y tampoco tienen TCR (receptor de linfocito T) ni BCR (receptor de linfocito B) por lo tanto constituyen un tercer tipo de células del linaje linfoide, estos ejercen una acción citolítica y esta acción depende de la presencia en su superficie de Receptores para el Fc (fracción cristalizable) de las inmunoglobulinas, específicamente Fc γ RIII o CD16 receptor de baja afinidad para las IgG por lo cual pueden reconocer células en las cuales dichas inmunoglobulinas estén unidas a un antígeno de superficie en la célula afectada dando lugar a la Citotoxicidad dependiente de an-

ticuerpos (ADCC). Las células NK se activan también al contacto con células infectadas por virus capaces de afectar la expresión del MHC y por lo tanto no reconocidas por los LTCD8 citotóxicos (Tizard, 2010; Sordillo *et al.*, 2005).

Se observan diferencias en la distribución de los LTCD4 y LTCD8 presentes en sangre y en leche. Los linfocitos CD4 en el periodo seco de la vaca, tienden a producir significativamente una cantidad mayor de citocinas de los tipos: γ -IFN e interleucinas (IL-1, IL-10 y IL-4). En la glándula mamaria, la IL-10 contribuye a regular las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8. Así mismo, la secreción de IL-1 e IL-2, IL-8 dirigen la migración leucocitaria de la sangre a la leche. Se ha observado que durante la mastitis bovina por *S. aureus* y *E. coli*, existen diferencias en la expresión de citocinas dependiendo del agente causal (Lee *et al.*, 2006).

En la secreción mamaria, la relación es siempre más baja que en la sangre y con más altas proporciones de T linfocitos CD8+ supresores (Park *et al.*, 1992; Mallard *et al.*, 1998). La predominancia de las células CD8+ en la glándula mamaria y sus secreciones sugiere un amplio rango de funciones de estas células, que además de un supresor en la ubre que constituye una desventaja, también incluye efectos defensivos como citotoxicidad y remoción de células dañadas (Yamaguchi *et al.*, 1999).

Durante el período del *peripartum*, las vacas de alta producción son especialmente susceptibles a la mastitis, indicándose la existencia de un compromiso del inmunosistema causado principalmente por un stress fisiológico por la repentina alta producción de leche al parto, con disminución de los neutrófilos circulantes capaces de fagocitar, una respuesta inflamatoria retardada y una nula capacidad destructiva de los neutrófilos (Burvenich *et al.* 2000). Durante el *peripartum* la relación CD4+:CD8+ es menor que 1.0 y si la glándula mamaria está infectada con *S. aureus* la relación es aún más baja, con supresión de la blastogénesis linfocitaria (Park *et al.* 1993).

Está claro que en la mastitis bovina las variaciones de los leucocitos observadas en diferentes etapas de la lactancia sugieren que los mecanismos defensivos dependen en gran medida de las respuestas de la inmunidad mediada por los T linfocitos; así, estudios recientes indican que las vacas que presentan relaciones

CD4+:CD8+ menores de 1.0 en ambos sistemas, sangre periférica y secreciones mamarias, son animales significativamente más susceptibles a la mastitis (Park et al. 2004).

FAGOSITOSIS Y ESTRÉS CALÓRICO EN LA MASTITIS

Los nuevos escenarios climáticos advierten consecuencias serias en el bienestar animal y la producción agropecuaria (Hernández *et al.*, 2011). El ganado lechero en su adaptación desarrolla mecanismos compensatorios fisiológicos, metabólicos y de comportamiento para reducir los efectos adversos del clima (Mader *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2015). La aclimatación de los animales a un entorno natural cambiante se produce como un proceso adaptativo (Bernabucci *et al.*, 2010). Los animales mantienen el balance térmico en respuesta a las temperaturas extremas del ambiente circundante mediante la termorregulación (Arias *et al.*, 2008). Los animales en la zona termo-neutral de “confort” animal, no producen gastos significativos de la energía metabólica para mantener la temperatura corporal a través de la termorregulación sin mostrar alteraciones en las funciones metabólicas y de conducta animal (Schüller *et al.*, 2014). Al ser afectada la zona ambiental de confort en los animales, se produce estrés celular afectándose el metabolismo y la homeostasis (Kelly *et al.*, 2001).

El estrés calórico se produce asociado a eventos extremos del clima con una temperatura ambiental elevada, aumento en la radiación solar, cambios en la humedad relativa y en la velocidad del aire (Hahn *et al.*, 2003). El efecto del estrés calórico altera los parámetros fisiológicos y el comportamiento repercutiendo de forma negativa la eficiencia productiva del ganado (Rhoads *et al.*, 2009).

Se ha estudiado que el ganado lechero muestra diferentes genotipos raciales que aumentan la adaptación a las temperaturas ambientales elevadas (Ravagnolo y Misztal, 2000). Los animales termotolerantes expresan ciertos genes como hormona del crecimiento (b-GH), β -caseína (CSN3), lactoalbúmina (LAA), HSP70 y proteínas asociadas al estrés celular inducido por el aumento de la temperatura ambiental (Sonna *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2007; Mohanarao *et al.*, 2014). La expresión del gen HP70 se ha relacionado con la producción de proteínas del choque térmico que posi-

bilitan la adaptación de ganado al afectarse la temperatura de confort por el incremento en la temperatura ambiental (Bañuelos-Valenzuela y Sánchez-Rodríguez, 2005). Identificándose diferentes polimorfismos del gen HSP70 (Basiricó *et al.*, 2011; Bhat *et al.*, 2016)

En México existe diversidad de climas y agroecosistemas, por lo que es importante identificar los indicadores de adaptación del ganado bovino a diferentes condiciones ambientales, y su posible influencia en la presencia de la mastitis. En estudios recientes se identificó polimorfismos en el gen HSP70 y su relación a la resistencia y susceptibilidad a la mastitis (Cheng *et al.* 2009; Huang *et al.*, 2015). En la mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*, se afecta la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos (Sladek *et al.*, 2005; Montoya *et al.*, 2015). El gen HSP70 codifica proteínas que intervienen en las vías de inducción de la apoptosis para proteger a la célula (Joly *et al.*, 2010). Por lo que el polimorfismo en el gen puede determinar, la susceptibilidad a mastitis inducida por los mecanismos apoptóticos influenciada por factores climáticos regionales.

Este equipo de trabajo realizó un estudio encaminado a determinar la diversidad genética en el gen HSP70 de ganado Holstein, *Bos taurus* y cruza de *Bos indicus* en las regiones del altiplano y el Golfo de México y su relación con la apoptosis de los neutrófilos inducida por *Staphylococcus aureus* en los grupos de vacas lecheras que habitan en las regiones de clima templado y tropical húmedo.

Obteniendo como resultados la amplificación del gen HSP70 en las vacas estudiadas de los grupos procedentes de las dos regiones climáticas de México, al detectar en las muestras de los productos del PCR un amplicón de 570pb. En los productos de la digestión con la enzima *MspI*, se observaron dos fragmentos de restricción de 341pb y 229pb. El análisis de los perfiles de electroforesis de los fragmentos de restricción mostró un monomorfismo del fragmento amplificado del gen HSP70 en el total de las vacas de los grupos de estudio, en las regiones RA del altiplano caracterizado por un clima templado y RG del Golfo de México con un clima tropical.

Al evaluar la inducción de apoptosis de los neutrófilos obtenidos de las vacas de las región RA, en los tratamientos con la cepa de *S. aureus* capsular serotipo 5 (SaC5) del total de muestras analizadas (n=15), catorce presentaron apoptosis alta (MA) >45%. Cuando se

probó la apoptosis *in vitro* de neutrófilos de vacas de la región RA con la cepa de *S. aureus* de tipo compacto (SaC), 10 individuos se encontraron en la escala de apoptosis BA y 5 en la MA.

En las vacas lecheras sometidas al efecto del estrés calórico, la producción láctea baja (Bernabucci, *et al.* 2014). En respuesta al estrés calórico las células del organismo sobreexpresan las proteínas de la familia Hsp denominadas “del choque térmico” (Mayer y Bukau 2005). La expresión de la proteína Hsp70 es emplea como un marcador e indicador a la resistencia al estrés por calor, al mostrar una actividad chaperona y citoprotectora, al producirse la síntesis en respuesta a condiciones de temperatura ambiental elevada y estrés metabólico (Joly *et al.* 2010).

En nuestro estudio el hallazgo del monomorfismo identificado por los dos fragmentos de restricción 341pb y 229pb puede ser relacionado con el proceso adaptativo de las vacas lecheras cruzas de *Bos indicus* en la región del golfo de México, Veracruz y en las vacas de la raza Holstein *Bos taurus* de la región del altiplano estado de Mexico. El gen HSP70, asociado a la expresión de las proteínas Hsp70 en el ganado bovino manifiestan las características adaptativas de una resistencia natural al estrés térmico en el ganado criollo en clima tropical y semidesértico (Bañuelos-Valenzuela y Sánchez-Rodríguez, 2005).

Así mismo se ha reportado que el polimorfismo del gen HSP70 en las vacas lecheras, puede estar asociado a la susceptibilidad en la ocurrencia de mastitis (Cheng *et al.* 2009; Huang *et al.*, 2015). En contraste el monomorfismo del gen HSP70 identificado en las dos poblaciones estudiadas las regiones climáticas en México las vacas lecheras puedes expresar la proteína funcional Hsp70 en diferentes condiciones de temperatura, lo cual se ha atribuido la adquisición de genes asociados a la termotolerancia (Paula-Lopes *et al.* 2003; Eitam *et al.*, 2009).

El monomorfismo observado en el gen HPS70 en las vacas de las regiones de clima tropical en Veracruz y Templado en Toluca se manifiesta en características genéticas del proceso de adaptación ambiental, la fijación de alelos es mayor en las poblaciones pequeñas cerradas como las mostradas en el estudio, explicada debido a que las secuencias de los genes de la familia HSP70 en *Bos indicus* son muy conservadas (Kumar *et al.*, 2015).

Así mismo se ha señalado que el efecto del estrés calórico a largo plazo en las vacas lecheras, acentúa la expresión de proteína de choque térmico y la alfa S1-caseína (Eitam *et al.*, 2009). También es posible que el estrés oxidativo generado en las células producto del estrés térmico, pueda afectar la respuesta inmune innata en la glándula mamaria a través de la actividad de fagocitosis por neutrófilos, aumentando la susceptibilidad de las vacas a la mastitis y otras enfermedades (Sordillo y Aitken, 2009; Jingar *et al.*, 2014). Así mismo, el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), provoca un estrés oxidativo celular en los tejidos (Sordillo 2005; Sunil *et al.*, 2010). Además de la inducción de apoptosis *in vitro* en respuesta a la exposición de los neutrófilos al *Staphylococcus aureus*, como puede ocurrir de forma natural en la mastitis en el ganado lechero (Montoya *et al.*, 2015).

El gen HSP70 relacionado en la adaptación a los cambios ambientales de temperatura adversos asociado a los efectos del cambio climático (Townsend, *et al.*, 2002; Martínez, *et al.* 2004; Sánchez-Rodríguez, 2007; Trejo *et al.*, 2011).

CONCLUSIÓN

El sistema de defensa en la glándula mamaria se mantiene a través de diversas barreras físicas y químicas que evitan la infección glandular. La fagocitosis es un mecanismo de defensa desarrollado por los neutrófilos y macrófagos que constituyen una barrera celular que limita el desarrollo de la infección glandular, además de contribuir al desarrollo de la inmunidad en la glándula mamaria. A su vez la presencia en la leche de diversos inhibidores bacterianos endógenos contribuye a limitar el crecimiento bacteriano en la leche. El desarrollo de la mastitis produce cambios celulares y químicos que indican la severidad de la enfermedad y su evolución. La instrumentación de programas de prevención y control de la mastitis es una estrategia importante para mantener la salud de la glándula mamaria en la vaca lechera. El estudio de la distribución de los genes asociados a la termotolerancia como el gen HSP70, es de importancia estratégica en la selección de los animales adaptados a condiciones ambientales adversas que afectan a la producción lechera.

LITERATURA CITADA

- Ackermann, M.R., Kehrli, E., Laufer, J.A., Nusz, L.T. (1996). Alimentary and respiratory tract tension in eight medically fragile Holstein cattle with bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD). *Vet Pathol*, 33:273-281.
- Allore, H.G., Jones, L.R., Merrill, W.G. y Oltenacu, P.A. (1995). A decision support system for evaluating mastitis information. *J Dai Sci*, 78:1382-1398.
- Arias, R.A., Mader, T.L., Escobar, P.C. (2008). Factores climáticos que afecta el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Arch Med Vet*. 40: 7-22.
- Auldism, M.J., Coats, G., Rogers, L. y McDowell, G.H. (1995). Changes in the composition of milk from normal and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Aust. J. Exp. Agric*, 35: 427 – 436.
- Bañuelos-Valenzuela, R., Sánchez-Rodríguez, S, (2005). La proteína de estrés calórico Hsp70 funciona como un indicador de adaptación de los bovinos a las zonas áridas. *Rev electrón vet*. 6: 1-15.
- Bernabucci, U., Biffani, S., Buggiotti, L., Vitali, A., Lacetera, N., Nardone, A. (2014). The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci*, 97: 471-486.
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., Ronchi, B., Nardone, A. (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domestic ruminants. *J Anim Sci*. 4: 1167-1183.
- Berning, L.M., y Shook, G.E. (1992). Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N-acetyl-Dglucosaminidase, and lactose. *J. Dairy Sci*. 75:1840-1848.
- Brown, W.C., Rice-Ficht, A.C., Estes, A.C., Estes, D.M. (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol*, 63:45-55.
- Capuco, A.V., Bright, S.A., Pankey, J.W., Wood, D.L., Miller, R.H. y Bitman, J. (1992). Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J Dairy Sci*, 75(8):2126-2130.
- Capuco, A.V., Mein, G.A., Nickerson, S.C., Jack, L.J., Wood, D.L., Bright, S.A., Aschenbrenner, R.A., Miller, R.H. y Bitman, J.

- (1994). Influence of pulsation less milking on teat canal keratin and mastitis. *J Dairy Sci*, 77(1):64-74
- Capuco, A.V., Wood, D.L., Bright, S.A., Miller, R.H. y Bitman, J. (1990). Regeneration of teat canal keratin in lactating dairy Cows. *J Dairy Sci*. 73(7): 1745-1750.
- Cheng, W.J., Li, Q.L., Wang, C.F., Wang, H.M., Li, J.B., Sun, Y.M., y Zhong, J.F. (2009). Genetic polymorphism of HSP70-1 gene and its correlation with resistance to mastitis in Chinese Holstein. *Genetics*. 31, 169-174.
- Concha, C., Holmberg, O. y Morein, B. (1978). Proportion of B- and T-lymphocytes in normal bovine milk. *J Dairy Sci*. 45: 287-290.
- Dekkers, J.C., Mallard, B.A. y Leslie, K.E. (1994). Workshop: genetic improvement of resistance to mastitis of dairy cattle with special emphasis on somatic cell count. *J Dairy Sci*. 77(2):616-8.
- Diez-Fraile, A., Meyer, E., Duchateau, L. y Burvenich, C. (2004). Effect of proinflammatory mediators and glucocorticoids on L-selectin expression in peripheral blood neutrophils from dairy cows in various stages of lactation. *Am J Vet Res*. 65:1421-1426.
- Eitam, H., Brosh, A., Orlov, A., I-zhaki, I., y Shabtay, A. (2009). Caloric stress alters fat characteristics and Hsp70 expression in milk somatic cells of lactating beef cows. *Cell Stress and Chaperonas*. 14: 173-182.
- Fitzpatrick, J.L., Cripps, P.J., Hill, A.W., Bland, P.W. y Stokes, C.R. (1992). MCH class II expression in the bovine mammary glands. *Vet. Immunol Immunopathol*. 32:13-23.
- Fox VA, Voelker DR, Campell PA, Cohen JJ, Bratton DL y Henson PM. (1992). Exposure of phosphatidilserine on the surface of apoptotic lymphocytes tiggers especific recobognition and removal by macrophages. *J. Immunol* 148:2207-2216
- Gengelbach, G.P. y Spears, J.W. (1998). Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production, and humoral immune response of calves. *J Dairy Sci*. 81(12):3286-92.
- Gerardi, A.S. (1996). Bovine leucocyte adhesion deficiency: a review of a modern disease and its implications. *Res Vet Sci*, 61(3):183-186.

- Hahn, G.L., Mader, T.L. y Eigenberg, R.A. (2003). Perspectives on development of thermal indices for animal studies and management. In: Interactions between climate and animal production. Wageningen: Wageningen Academic publications, pp 31-44.
- Harmod, R.J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci.* 77(7):2103-2112.
- Hass, Y.D., Veerkamp, R.F., Barkema, H.W., Grohn, Y.T. y Schukken, Y.H. (2004). Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *J Dairy Sci.*, 83(1):95-105.
- Hernández, A., Cervantes, P., Domínguez, B., Muñoz-Melgarejo, S., Salazar-Lizán, S. y Tejeda-Martínez, A. (2011). Temperature - humidity index (THI) 1917 - 2008 and future scenarios of livestock comfort in Veracruz, México *Atmósfera.* 24: 89-102.
- Hernández, A., Cervantes, P., Salinas, V.M., García, A., Tejeda, A., Gallardo, F. y Álvarez, J.L. (2007). Respuesta al estrés por calor en la vaca Criollo Lechero Tropical bajo un sistema de doble propósito en México. *Revista de Salud Animal.* 29: 85-90.
- Hogan, J. y Smith, L.K. (2003). Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34:507-519.
- Hogan, J.S., Weiss, W.P. y Smith, K.L. (1993). Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J Dairy Sci.* 76(9):2795-803.
- Honkanen - Buzalski, Y., Kaartinen, L., Pyorala, S. (1995). The bovine udder and mastitis. Edt. M. Sandholm, pp. 312
- Huang, P., Lu, C., Li, J., Xu, J., Liu, Z., Wang, Q., Wang, Z., Huo, J., Li, H., Teng, Y., y Cai, Y. (2015). Mutations in HSP70-2 gene change the susceptibility to clinical mastitis in Chinese Holstein. *Gene*, 55:62-72.
- Jingar, S.C., Mehla, R.K. y Singh, M. (2014). Efecto climático sobre la ocurrencia de mastitis clínica en diferentes razas de vacas y búfalas. *Arch Zootec.* 63: 473-482.
- Joly, A.L., Wettstein, G., Mignot, G., Ghirighelli, F. y Garrido, C. (2010). Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun.* 2: 238-247.

- Kai, K., Komine, K., Komine, Y., Kuroichi, T., Kozutsumi, T., Kobayashi, J., Ohta, M., Kimura, H. y Kumagai, K. (2002). Lactoferrin stimulates A *Staphylococcus aureus* killing activity of bovine phagocytes in the mammary glands. *Microbiol Immunol.* 46(3):187-194.
- Kehrli, M.E. y Shuster, D.E. (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 77: 619-627
- Kehrli, M.E., Schmalstieg, C., Anderson, D.C., Van Der Maaten, M.J., Hughes, B.J., Akermann, M.R., Wilhemsen, C.L., Brown, G.B., Stevens, M.H. y Whetstone, C.A. (1990). Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein. *Am J Vet Res.* 51:1826-1836.
- Kelly, A.L., Reid, A., Joycre, W., Meaney, J., y Foley, J. (1998). Effect of decreased milking frequency of cow's in late lactation on milk somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte number, composition and enzymology. *J Dairy Res.* 65:365-373.
- Kelly, M.J., Tume, R.K., Newman, S.A. y Thompson, J.M. (2001). Environmental effects on the fatty acid composition of subcutaneous beef fat. *Aust J Exp Agr.* 41: 1023-1031.
- Kimura, K., Goff, J.P., Schmerr, M.J., Stabel, J.R. y Yokomizo, Y. (2008). Activation of immune cells in bovine mammary gland secretions by zymosan-treated bovine serum. *J Dairy Sci* 9(5):1852.1864.
- Kumar, A., Ashraf, S., Goud, T.S., Grewal, A., Singh, S.V., Yadav, B.R. y Upadhyay, R.C. (2015). Expression profiling of major heat shock protein genes during different seasons in cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) under tropical climatic condition. *J Therm Biol.* 51: 55-64.
- Landmann, R., Ludwig, C., Obrist, R. y Obrecht, J.P. (1991). Effect of cytokines and lipopolysaccharide on Lee, C.S., Wooding, F.B.P., y Kemp, P. (1980). Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J Dairy Res.* 47:39-50.

- Lee, J.W., Bannerman, D.D., Paape, M.J., Huang, M.K. y Zhao, X. (2006). Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet Res* 37:219-229.
- Leitner, G., Eligulashvily, R., Krifucks, O., Perl, S., Saran, A. (2003). Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 50(1):45-52.
- Mader, T.L., Davis, M.S. y Brown-Brandl, T.M. (2006). Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *J Anim Sci*. 84:712-719.
- Martínez, J. y Fernández, A. (2004) Cambio climático: una visión desde México, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. 1er edición. pp. 523.
- Mayer, M.P. y Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 62:670-84.
- Mehrzard, J., Paape, M. y Burvenich, C. (2010). Role of neutrophils in protection of udder from infection in high yielding dairy cows. *Iran J Vet Res*. 11(2): 102-118.
- Miller, R.H., Bitman, J., Bright, S.A., Wood, D.L. y Capuco, A.V. (1992). Effect of clinical and subclinical mastitis on lipid composition of teat canal keratin. *J Dairy Sci*. 75(6):1436-42.
- Min, L., Cheng, J., Shi, B., Yang, H., Zheng, N. y Wang, J. (2015). Effects of heat stress on serum insulin, adipokines, AMP-activated protein kinase, and heat shock signal molecules in dairy cows. *J Zhejiang Univ Sci B*. 16:541-548.
- Mohanarao, G.J., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohain, M., Dass, G., Brahma, B., Datta, T.K. y Upadhyay, R.C. (2014). HSP70 family genes and HSP27 expression in response to heat and cold stress in vitro in peripheral blood mononuclear cells of goat (*Capra hircus*). *Small Rum Res*. 116:94-99.
- Montoya, G.N., Peñuelas, R.C.J, Acosta-Dibarrat, J.P. y Velázquez, O.V. (2015). Actividad diferencial de fagocitosis e inducción de apoptosis in vitro por serotipos capsulares 5 y 8 de *Staphylococcus aureus* en neutrófilos de bovinos. *Rev Mex Cienc Pecu*. 6:99-108.

- Nagahata, H. (2004). Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. *J Vet Med Sci.* 66(12):1475-82.
- Nagahata, H., Kawai, H., Higuchi, H., Kawai, K., Yayou, K. y Chang, C.J. (2011). Altered Leukocyte Responsiveness in Dairy Cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J Vet Med Sci.* 73(1):885-894.
- Nickerson, S.C. (1989). Immunological aspects of mammary involution. *J. Dairy Sci.* 72:1665-1678.
- Nickerson, S.C., Owen, W.E. y Boddie, R.L. (1995). Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *J. Dairy Sci.* 78:1607-18.
- Oliver, S.P., Sordillo, L.M., (1988). Udder health in the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 71:2584- 2606
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Dettleux, J., Burvenich, C. (2002). Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7(2):109-121.
- Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X., Lee, J.W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res.* 34(5):597-627.
- Paula-Lopes, F.F., Chase, C.C., Al-Katanani, Y.M., Krininger, C.E., Rivera, R.M., Tekin, S., Majewski, A.C., Ocon, O.M., Olson, T.A. y Hansen, P.J. (2003). Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperature. *Reproduction.* 125: 285-294.
- Persson, K., Carlsson, A., Hambleton, C. y Guidry, A.J. (1992). Immunoglobulins, lysozyme and lactoferrin in teat and udder of the dry cow during endotoxin-induced inflammation. *Zentralbl Veterinarmed B.* 39(3):165-74.
- Philpot, W.N. (1994). Economics of mastitis control. *Vet Clin North Amer Large Anim Pract* 6(2): 233- 245.
- Politis, I., Zhao, X., McBride, B.W., Burton, J.H. (1992). Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 30:399-410.

- Prump, B.E., Berezesky, I.K., Chang, S.H., Phelps, P.C. (1997). The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicol Pathol*, 25(1):82-88.
- Rainard, P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet Res*. 4:647-670.
- Reinitz, D.M., Paape, M.J. y Mather, I.H. (1982). Effect of Phagocytosed Fat and Casein on the Intraphagosomal pH in Bovine Polymorphonuclear Leukocytes. *Proc Soc Expl Biol Med*, 170(3):281-285.
- Rhoads, M.L., Rhoads, R.P., VanBaale, M.J., Collier, R.J., Sanders, S.R., Weber, W.J., Crooker, B.A. y Baumgard, L.H. (2009). Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J Dairy Sci*. 92:1986-1997.
- Rinaldi, M., Moroni, P., Leino, L., Laihia, J., Paape, M.J., Bannerman, D.D. (2006). Effect of cisurocanic acid on bovine neutrophil generation of reactive oxygen species. *J Dairy Sci*, 89(11):4188-201.
- Rinaldi, M., Moroni, P., Paape, M.J. y Bannerman, D.D. (2007). Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunol Immunopathol*. 115 (1-2):107-125.
- Riollet, C., Rainard, P. y Potrel, B. (2000). Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv Exp Med Biol*. 480:247-58.
- Riollet, C., Rainard, P. y Poutrel, B. (2000b). Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 7: 161- 167.
- Rodríguez-Franco, D.A., Vázquez-Moreno, L., Ramos-Clamont, G.M. (2005). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev Latinoam Microbiol*. 47(3-4):102-111.
- Rosenberger, C.M., Finlay, B.B. (2003). Phagocyte sabotage: disruption of macrophages signalling by bacterial pathogens. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 4:385-96

- Sánchez-Rofríguez, S.H. (2007). El medio ambiente y su influencia en la adaptación de las especies. *Rev electrón vet.* 8:12b.
- Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. y Pyorala, S. (1995). Infection of the udder – Udder inflammation. In: *The bovine udder and mastitis*. Edt. M Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L Kaartinen, S Pyorala. 312.
- Schüller, L, Burfeind, O. y Heuwieser, W. (2014). Impact of Heat Stress on Conception Rate of Dairy Cows in the Moderate Climate Considering Different Temperature– Humidity Index Thresholds, Periods Relative to Breeding, and Heat Load Indices. *Theriogenology*. 81:1050–1057.
- Schutz, M.M., Vanraden, P.M. y Wiggans, G.R. (1994). Genetic variation in lactation means of somatic cell cores dor six breeds of dairy cattle. *J Dairy Sci*. 77(1): 284–293.
- Senft, B. y Neudecker, J. (1991). Defense mechanisms of the bovine mammary gland. *Tierarztl Prax*. 19(4): 357–363.
- Sladek, Z., Ryznarova, H. y Rysanek, D. (2006). Macrophages of the bovine heifer mammary gland: morphological features during initiation and resolution of the inflammatory response. *Anat Histol Embryol*. 35(2):116–124.
- Sohn, E.J., Paape, M.J., Bannerman, D.D., Connor, E.E., Fetterer, R.H., Peters, R.R. (2007). Shedding of sCD14 by bovine neutrophils following activation with bacterial lipopolysaccharide results in down-regulator of IL-8. *Vet Res*. 38(1):95–108.
- Sol, J., Sampimon, O.C., Snoep, J.J. y Schukken, Y.H. (1994). Factors associated with bacteriological cure after dry cow treatment of subclinical staphylococcal mastitis with antibiotics. *J Dairy Sci*. 77(1):75–79.
- Sonna, L.A., Fujita, J., Gaffin, S.L. y Lilly G.M. (2002). Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol*. 92:1725–1742.
- Sordillo, L. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest Prod Sci*. 98: 89–99.
- Sordillo, L.M. y Peel, J.E. (1992). Effect of interferon-gamma on the production of tumor necrosis factor during acute *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci*. 75:2119–2125.

- Sordillo, L.M. y Streicher, K.L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 7(2):135-146.
- Sordillo, L.M., Kendal, J.T., Cross, T.H., Corl, C.M. (2005). Molecular characterization of a saposinlike protein family member isolated from bovine lymphocytes. *J. Dairy Sci*. 88:1378-1390.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 80:1851.
- Sordillo, L.M. y Aitken, A.L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 1-3:104-109.
- Sunil, K.B.V., Kumar, A. y Meena, K. (2010). Effect of heat stress in tropical livestock and different strategies for its amelioration. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 7:45-54.
- Tizard, I. (2010). *Veterinary Immunology: an introduction*. 4th Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA. Pp. 568.
- Todhunter, D.A., Smith, K.L. and Hogan, J.S. (1995). Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 78:236.
- Townsend, A., Ortega-Huerta, M.A., Bartley, J., Sánchez-Cordero, V., Soberón, J., Buddemeier, R.H. y Stockwell, D.R.B. (2002). Future projections for Mexican faunas under global climate change scenarios. *Nature*. 416:626-629.
- Trejo, I., Martínez-Meyer, E., Calixto-Pérez, E., Sánchez-Colón, S., Vázquez-De la Torre, R. y Villers-Ruiz, L (2011). Analysis of the effects of climate change on plant communities and mammals in Mexico. *Atmósfera*. 24:1-14.
- Van Oostveldt, K., Paape, M.J., Dosogne, H., Burvenich, C. (2002). Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. *Domest Anim Endocrinol*. 22: 37-50.
- Vangroenweghe, F., Dosogne, H. y Burvenich, C. (2002). Composition and milk cell characteristics in quarter milk fractions of dairy cows with *Literatura citada* low cell count. *Vet J*. 164(3):254-60.
- Velázquez, V., Pescador, N., Gorodezky, C., Saltijeral, J. (2008). In vitro differential neutrophil phagocytosis activity on Sta-

- phylococcus aureus when obtained from blood and milk of dairy cows in early lactation period. *Rev Latinoam Microbiol*, 50(3,4):66-71.
- Velázquez-Ordoñez, V., Pescador, S.N., Gorodezky, C. y Saltijeral, O.J. (2005). Nivel de células somáticas en leche y resistencia de las vacas lecheras a la mastitis. *Producción Animal*. 20(207):15-23.
- Waage, A., Mork, T., Roros, A., Aasland, D., Hunshamar, A., Odegaard, S.A. (1999). Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 82: 712-719.
- Weiss, W.P., Hogan, J.S., Todhunter, D.A., Smith, J.L. (1997). Effect of vitamin E Supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary glands health of dairy cows. *J Dairy Sci.* 80(8):1728-1737.
- Wellnitz, O., Bruckmaier, R.M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J*, 192(2):148-152.
- Wellnitz, O., Reith, P., Haas, S.C. y Meyer, H.H.D. (2006). Immune relevant gene expression of mammary epithelial cells and their influence on leukocyte chemotaxis in response to different mastitis pathogens. *Veterinari Medicina*, 51(4): 125-132.
- Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B. y Zschöck, M. (2004). Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. México. pp. 12-37.
- Worku, M., Paape, M.J., Marquardt, W.W. (1994). Modulation of Fc receptors for IgG on bovine polymorphonuclear neutrophils by interferon gamma through de novo RNA transcription and protein synthesis. *Am J Vet Res*, 55:234-238.
- Xin, Z., Waterman, D.F., Hemken, R.W. y Harmon, R.J. (1991). Effects of copper status on neutrophil function, superoxide dismutase, and copper distribution in steers. *J dairy Sci.* 74(9):3078-3085.
- Zecconi, A., Hamann, J., Bronzo, V., Moroni, P., Giovannini, G. y Piccinini, R. (2000). Relationship between teat tissue immune defense and intramammary infections. *Adv Exp Med Biol.* 480:287-293.
- Zhao, X. y Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci.* 86(13):57-65.