

**EFFECTO DEL DIA DEL CICLO ESTRAL SOBRE EL RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LECHE CAPRINA Y SOBRE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN GLANDULA MAMARIA****S. Acuña<sup>1\*</sup>, J.P.Damián<sup>1</sup>, E. van Lier<sup>2</sup>,****G. Pisoni<sup>3</sup>, P. Moroni<sup>3</sup>, A.Meikle<sup>1</sup>**

Área Bioquímica<sup>1</sup>, Dpto. de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria; Dpto. de Producción Animal y Pasturas<sup>2</sup>, Facultad de Agronomía, Montevideo-Uruguay y Facolta' di Veterinaria, Milán-Italia<sup>3</sup>.

\*saap22@ adinet.com.uy

**RESUMEN**

Se investigó el efecto del día del ciclo estral sobre el Recuento de Células Somáticas (RCS) en leche y el efecto de la fase del ciclo estral sobre la expresión del receptor de estrógenos a (REa) en la glándula mamaria (GM) de cabras. El RCS fue superior en la fase folicular que en la luteal. El inmunomarcado para el REa fue detectado exclusivamente en las células epiteliales y fue más elevado en el estro. El alto RCS encontrado en el estro, está asociado a una mayor expresión de REa que estimularía la proliferación de las células epiteliales y/o otros mecanismos que podrían explicar el incremento del RCS encontrado al estro.

**SUMMARY**

The effect of the day of the estrous cycle on somatic cell count (SCC) in milk was investigated daily and the effect of the stage of the estrous cycle on estrogen receptor a (ERa) expression in the goat mammary gland. SCC was higher during the follicular than during the luteal phase. Immunostaining was exclusively detected on epithelial cells and the staining was higher at estrus. The high SCC at estrus is associated with higher ERa expression that stimulate proliferation of epithelial cells and/or other mechanisms which may explain the SCC increase found at estrus.

**INTRODUCCIÓN**

El RCS sirve como medida indirecta de calidad de leche y está negativamente correlacionado con la producción diaria de leche en cabras (1). Incluye a las células epiteliales y fundamentalmente a los polimorfos nucleares (2). A diferencia de los que ocurre en bovinos, el RCS en caprinos está sometido a mayores variaciones fisiológicas que dificultan establecer límites de calidad de leche en función del mismo (3). Factores como la edad (4), fase de lactación (5) y producción de leche (3) afectan el RCS en la leche de cabra. En ruminantes, los incrementos en el RCS al estro son controvertidos (6,7,8). Los estrógenos (E) estimulan la proliferación epitelial y actúan como inmunomoduladores en la GM de rata actuando a través de receptores intracelulares específicos (RE)

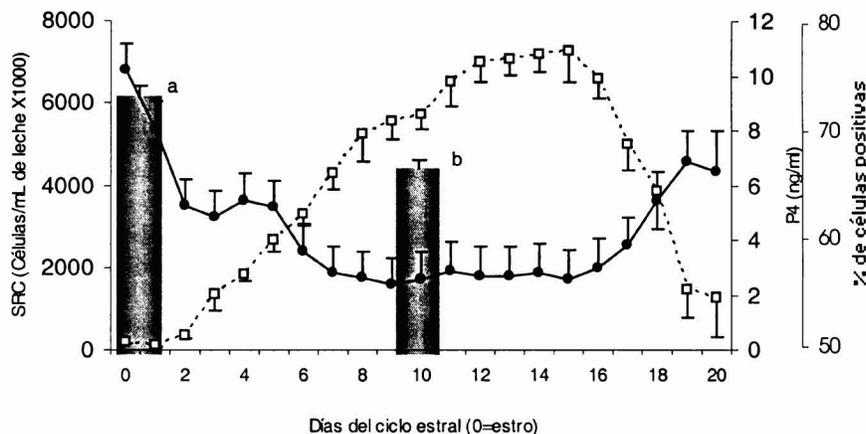
(9,10). En bovinos se ha descrito el RE en GM (14) pero no hemos encontrado trabajos al respecto en caprinos. En este estudio se investigó el efecto del estro espontáneo sobre el RCS en la leche de cabras y la presencia de REa en la GM, así como el efecto de la fase del ciclo estral (folicular vs luteal) sobre la expresión de dicho receptor.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron 22 cabras Saanen, de segunda lactación con 9 a 10 meses de lactación, libres de brucelosis, tuberculosis y micoplasmosis. El estudio se realizó en noviembre, en Italia (otoño), región de Alejandría, latitud 45° N, longitud 10° E, altitud 880 m. Se detectó estro espontáneo con un macho vasectomizado. A partir de la detección del celo, se tomaron muestras de sangre de la yugular a 14 cabras todos los días hasta el siguiente estro. La confirmación del día 0 se realizó por los niveles plasmáticos de progesterona (P4) determinados por RIA (DPC, California, USA). Las muestras de leche, fueron tomadas dos veces por día, cada día durante todo el ciclo. El RCS fue por conteo automático con microscopio fluorescente (Bentley Somacount150, Bentley Instrument, USA). Se utilizó brumuro de Etidio para la unión específica al ADN nuclear. De las 8 cabras restantes: 4 se sacrificaron al estro (día = 0, n=4) y 4 al día 10 del estro (día=10, n=4). Al momento del sacrificio, las muestras de GM (1cm x 1cm) se fijaron en paraformaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina para inmunohistoquímica (11). El inmunomarcado fue clasificado según la intensidad de la tinción en una escala de: (-) ausente, (+) leve, (++) moderado, (+++) intenso; y expresado como promedio (12). El RCS y la concentración de P4 fue analizada por el procedimiento mixto (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 2000), incluyendo el efecto del día del ciclo. El porcentaje de núcleos positivos y la tinción promedio fueron analizados por el procedimiento mixto que incluyó el efecto del observador y día del ciclo estral.

**RESULTADOS**

El RCS fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ), al estro (día 0) en relación al resto del ciclo estral. A medida que la P4 fue aumentando, el RCS decreció marcadamente y se mantuvo bajo durante toda la fase luteal. Al final de la fase luteal, cuando los niveles de P4 cayeron marcadamente, el RCS se incrementó, llegando a los niveles encontrados en fase folicular (ver figura). El inmunomarcado para el REa fue detectado exclusivamente en las células epitelio-alveolares de la GM. El contenido de células alveolares positivas fue superior a las negativas en ambos días (0 y 10). El porcentaje de núcleos positivos fue mayor ( $p < 0,0001$ ) al día 0 que al 10 (ver figura).



Recuento de Células Somáticas (RCS, células/mL de leche X1000)(.), concentraciones de P4 plasmática (ng/mL) (■), (medias ± EEM) de cabras lecheras (n =14) durante el ciclo estral espontáneo y porcentaje de células positivas a REα de la GM, al día 0 (n=4) y 10 (n=4) (barras). En las barras, letras diferentes indican diferencias (p<0,001).

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en caprinos realizado sobre el ciclo estral espontáneo en cabras que demuestra que el RCS varía durante el mismo, aumentando durante el estro. Aumentos de RCS fueron encontrados en estros inducidos en cabras en anestro estacional (8) y en ganado vacuno luego del estro espontáneo (6). Además se describen por primera vez los REα en GM de cabra. Los REα se encontraron sólo en las células epitelio-alveolares y no en el estroma, similar a lo reportado en GM de rata (13). Estos autores demostraron la participación del REα en la proliferación de las células epiteliales, en coordinación con el tratamiento con E2. Mayores niveles de REα al estro son consistentes con el estímulo conocido de los E sobre la síntesis de sus propios receptores (10). Ambas variables (aumento de REα y de RCS) confirman el predominio estrogénico de la fase folicular. En la fase lútea la P4 inhibe la expresión de REα, como ha sido demostrado en otros tejidos (10) y concuerda con una disminución del RCS. En éste estudio no se puede demostrar que tipo celular contribuye al alto RCS al estro, pero podría explicarse por la acción de los E en la GM que incrementan la proliferación y exfoliación epitelial como ha sido demostrado en rata (13). Además, sugerimos que las acciones de los E en la GM que provocan altos RCS al estro estarían potenciadas por el incremento en la sensibilidad a los E (contenido de RE) de la GM.

### AGRADECIMIENTOS

A Isabel Sartore por la determinación de los receptores de E de la GM.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Zeng, S. S., et al. (1997). Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. *Small Ruminant Res.* 26:253-260.

2. Boutinaud M., et al. (2002). Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *J. Anim. Sci.* 80:1258-1269.

3. Zeng, S. S., et al. (1995). Effect of parity and milk production on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. *Small Ruminant Res.* 17:269-274.

4. Sanchez, A., et al.(1999). Parity as a risk factor for caprine subclinical intramammary infection. *Small Ruminant Res.* 31:197-20.

5. Rota, A. M., et al. (1993). Somatic cell types in goats milk in relation to total cell count, stage and number of lactation. *Small Ruminant Res.* 12:89-98.

6. King, J. O. L. (1977). The effect of oestrus on milk production in cows. *Vet. Rec.* 101:107-108.

7. Guidry, A., et al.(1975). Effects of estrus and exogenous estrogen on circulating neutrophils and milk somatic cell count concentration, neutrophil phagocytosis, and occurrence of clinical mastitis in cows. *Am. J. Vet. Res.*36:1555-1560.

8. McDougall, et al. (2002). Influence of Estrus on Omatic Cell Count in Dairy Goats. *J. Dairy Sci.* 85: 378- 383.

9. Weisz-Carrington P, et al. (1978). Hormonal induction of the secretory immune system in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun;75(6):2928-32.

10. Ing N. H., et al. (1993). Progesterone and Estrogen. *Genes in Mammalian Reproduction Genes in Mammalian. Rep.* Wiley-Liss, Inc.N.Y.: 271-291.

11. Meikle A., et al. (2000).A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Reproduction.Reproduction. Nutrition and Development,* 40: 283-293.

12. Boss A., et al.(1996). Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle *Anim. Reprod. Sci.* 44: 11-21.

13. Cheng G.,et al. (2004). Estrogen receptors ERα and ERβ in proliferation in the rodent mammary gland. *Physiology,* Vol 101, 11: 3739-3746.

14. Schams D., et al. (2003) Expression and localisation of oestrogen and progesterona receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *Journal of Endocrinology* 177, 305-317.