

# METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ Y SUS INHIBIDORES EN LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA Y SU RELACIÓN CON LA PERSISTENCIA DE LAS INFECCIONES INTRAMAMARIAS POR *Staphylococcus aureus*.

**Chervaz, Victoria<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Cientibecaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL  
Directora: Dra. Dallard, Bibiana Codirectora:  
Dra. Pereyra, Elizabet

**Área: Ciencias Biológicas**

## INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es uno de los mayores factores limitantes a la rentabilidad de la producción lechera en el mundo. *Staphylococcus aureus* es el patógeno mayor más frecuentemente aislado de mastitis bovina en Argentina y en el mundo. Los programas de control de mastitis se basan principalmente en higiene durante el ordeño, terapia antibiótica y descarte de animales infectados crónicos. Sin embargo, las particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas de control tradicionales, tendiendo a producir infecciones crónicas que ocasionan daño permanente al tejido mamario (Aitken y col., 2011).

La glándula mamaria (GM) bovina es altamente susceptible a las nuevas infecciones intramamarias (IIM) durante la etapa temprana del periodo de vaca seca y el parto, cuando las defensas están deprimidas. Las IIM que se originan en el periodo no lactante pueden reducir la producción láctea hasta en un 35% en la lactancia subsiguiente. Durante la involución, la GM experimenta una intensa remodelación tisular que implica la muerte coordinada de células epiteliales y estromales, degradación de la matriz extracelular (MEC) y regeneración del tejido adiposo (Norgaard y col., 2008).

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que escinden selectivamente sustratos como los de la MEC y péptidos de quimioquinas, actuando durante la remodelación normal de los tejidos y durante el daño tisular asociado a la inflamación. La actividad de las MMPs en el espacio extracelular está regulada por inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). Los TIMPs presentan diversas funciones entre las que se pueden mencionar: capacidad para inhibir las MMPs activas, controlar la activación de las pro-MMPs, promover el crecimiento celular, inhibir la angiogénesis e inducir la apoptosis (Brew y col., 2000).

Título del proyecto: Asociación entre genotipos bacterianos y persistencia de las infecciones intramamarias por *Staphylococcus aureus* en bovinos.

Instrumento: PICT-2014-1324. Año convocatoria: 2014

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)

Director/a: Dra. Bibiana E. Dallard.

Las células epiteliales mamarias, fibroblastos del tejido conjuntivo, las células inflamatorias que infiltran el tejido y las que migran a la leche como los neutrófilos y macrófagos son considerados el principal recurso de MMPs (Raulo y col.,

2002). Rabot y col. (2007) proponen que, en forma similar a lo que ocurre en ratones, la involución de la GM bovina se desarrolla en dos fases: una inicial (día 1 a 5 de la involución), donde la expresión de MMPs y sus inhibidores se encuentra regulada negativamente, y otra fase tardía (día 14 a 28 de la involución) donde la expresión de proteinasas se encuentra regulada positivamente.

Nagahata y col. (2011) caracterizaron la respuesta inflamatoria de la GM bovina durante la infección crónica por *S. aureus* y observaron niveles elevados de MMP-2 y MMP-9 en leche de los animales infectados. Este incremento fue asociado a la promoción de la migración de neutrófilos a los cuartos inflamados y al aumento en la expresión de moléculas de adhesión como L-selectina en la superficie de macrófagos y neutrófilos de la leche. En bovinos lecheros una remodelación aberrante de la GM dada por la mastitis conduce a una disfunción de la misma y a una lactación deficiente. Por lo tanto, investigar el rol de las MMPs y sus inhibidores en las IIM crónicas causadas por *S. aureus*, permitirá una comprensión más completa de la patogenia de esta enfermedad.

## OBJETIVO

En base a los antecedentes planteados, el objetivo general de este trabajo fue evaluar la localización específica y expresión proteica de MMP-2 y MMP-9 y sus inhibidores (TIMP-1 y TIMP-2) en tejido mamario bovino y establecer diferencias en cuartos sanos e infectados con *S. aureus* durante la involución activa.

## METODOLOGÍA

Se utilizaron vacas Holando Argentino no preñadas en la etapa final de la lactancia. El estado de infección de cada cuarto mamario fue determinado seis meses antes del inicio del experimento y confirmado 20 y 3 días previos a la interrupción de la lactancia o secado. Se tomaron como unidades experimentales a los cuartos mamaros. Se utilizaron cuartos mamaros libres de IIM (n=15) y cuartos con IIM crónicas por *S. aureus* (n=15). Para identificar infecciones crónicas, se realizaron cultivos bacteriológicos a partir de leche cada 21 días. Se definió como IIM crónica al aislamiento del mismo organismo a partir de tres muestras consecutivas a intervalos de 21 días. Se obtuvieron muestras de tejido mamario a los 7, 14 y 21 días luego del último ordeño. Muestras provenientes de cuartos sanos (n=5) e infectados crónicos por *S. aureus* (n=5) fueron incluidas en cada grupo (7, 14 y 21 días). Los tejidos fueron procesados según técnicas histológicas de rutina e incluidos en parafina.

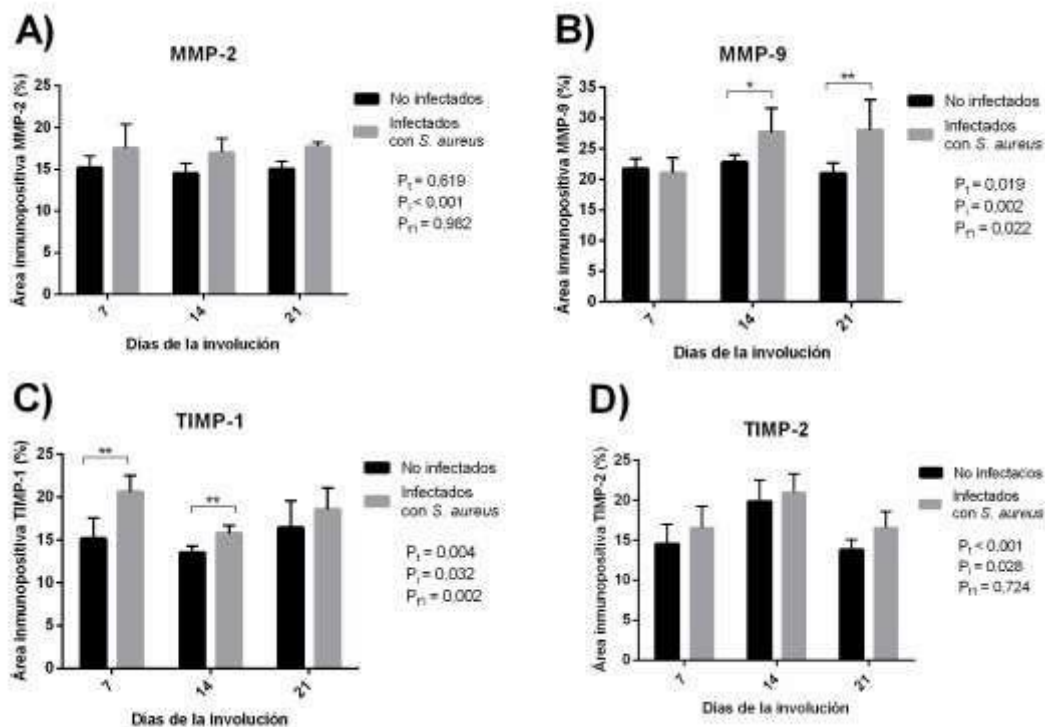
Para la identificación en tejido mamario de las enzimas MMP-2 y MMP-9 y de sus inhibidores (TIMP-1 y TIMP-2) se realizó inmunohistoquímica utilizando el método streptavidina-biotina-inmunoperoxidasa. Brevemente, las secciones de tejido fueron desparafinadas, hidratadas y tratadas con recuperación antigénica. La actividad de la peroxidasa endógena fue inactivada con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero normal de cabra al 10%. Las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios que se detallan a continuación durante 18 hs a 4°C: anti MMP-2 (1:400), anti MMP-9 (1:50), anti TIMP-1 (1:100) y anti TIMP-2 (1:100). Luego de 2 lavados consecutivos de 5 minutos cada uno en PBS, las secciones se incubaron durante 30 minutos a 25°C con un anticuerpo secundario universal, a excepción de MMP-9 en el cual se utilizó anticuerpo secundario anti-cabra. La visualización del antígeno se realizó por el método streptavidina-peroxidasa utilizándose como cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB). Por último, los cortes fueron lavados en agua destilada, contracolorados con hematoxilina, deshidratados y montados. Como controles negativos se

sustituyó el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario biotinilado por suero no inmune.

La semicuantificación de la expresión de cada proteína se realizó mediante análisis digital de imágenes utilizando el programa Image Pro-Plus 3.0.1®. (Media Cybernetics). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó ANOVA factorial que evalúa los efectos del tiempo (t) de la infección (i) y de la interacción infección\*tiempo (t\*i), utilizando el programa SPSS 11.0 para Windows.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

La inmunomarcación para MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2 se presentó en todas las secciones de tejido, tanto en los cuartos infectados crónicamente con *S. aureus* como en sanos, asociada al citoplasma de células epiteliales alveolares y conductos excretores del parénquima mamario. En el estroma interalveolar y en el interior de conductos y alvéolos se observaron células del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos con su citoplasma inmunoreactivo. Para el caso de MMP-9 también se observó marcación nuclear de las células epiteliales y estromales. Los componentes de la MEC no reaccionaron a la inmunomarcación con ninguno de los anticuerpos utilizado, mientras que las células endoteliales de los vasos sanguíneos mostraron reacción positiva. En la Figura 1 se grafican los porcentajes de inmunomarcación para los diferentes anticuerpos.



**Figura 1:** Porcentaje de área inmunomarcada para A) MMP-2, B) MMP-9, C) TIMP-1 y D) TIMP-2 en glándula mamaria sana e infectada crónicamente con *S. aureus* a los 7, 14 y 21 días de involución. Las barras representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada en los cuartos mamarios evaluados  $\pm$  el desvío estándar (DE). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada periodo de tiempo evaluado (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

La expresión de MMP-2 se vio influenciada por el proceso infeccioso ( $p < 0,001$ ), observándose porcentajes de inmunomarcación mayores en los cuartos infectados con respecto a los sanos en todos los periodos evaluados. No se observó efecto del tiempo de la involución ( $p = 0,619$ ), ni tampoco interacción entre estado infecciosos y tiempo de muestreo ( $p = 0,982$ ).

La expresión de MMP-9 se vio influenciada por el tiempo de la involución ( $p = 0,019$ ) y por el proceso infeccioso ( $p = 0,002$ ), observándose interacción entre ambos factores ( $p = 0,022$ ). Los porcentajes de marcación para esta enzima fueron mayores en cuartos infectados con respecto a cuartos sanos al día 14 ( $p = 0,028$ ) y 21 ( $p = 0,017$ ) de la involución, mientras que al día 7 no se observaron diferencias ( $p = 0,634$ ).

La expresión de TIMP-1 se vio influenciada por el tiempo de la involución ( $p = 0,004$ ) y por el proceso infeccioso ( $p = 0,032$ ), observándose interacción entre ambos factores ( $p = 0,002$ ). Los porcentajes de marcación para esta enzima fueron mayores en cuartos infectados con respecto a los cuartos sanos al día 7 ( $p = 0,004$ ) y 14 ( $p = 0,002$ ) de la involución, mientras que al día 21 no se observaron diferencias ( $p = 0,275$ ).

La expresión de TIMP-2 se vio influenciada por el tiempo de la involución ( $p < 0,001$ ), por el proceso infeccioso ( $p = 0,028$ ), no observándose interacción entre ambos factores ( $p = 0,724$ ).

Se puede concluir que la IIM crónica por *S. aureus* modifica la expresión de las MMPs y sus inhibidores lo cual podría influir en forma directa en el proceso de remodelación de la GM durante la involución conduciendo a una disfunción de la misma.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Aitken S., Corl C., Sordillo L.**, 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16, 291-304.
- Brew K., Dinakarpanian D., Nagase H.**, 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 1477, 267-283.
- Nagahata H., Kawai H., Higuchi H., Kawai K., Yayou K., Chang C.**, 2011. Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Vet Medical Sci*. 73, 885-894.
- Norgaard J., Theil P., Sorensen M., Sejrsen K.**, 2008. Cellular mechanisms in regulating mammary cell turnover during lactation and dry period in dairy cows. *J Dairy Sci*. 91, 2319-2327.
- Rabot A., Sinowatz F., Berisha B., Meyer H., Schams D.**, 2007. Expression and localization of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in the bovine mammary gland during development, function, and involution. *J Dairy Sci*. 90, 740-748.
- Raulo S., Sorsa T., Tervahartiala T., Latvanen T., Pirilä E., Hirvonen J., Maisi P.**, 2002. Increase in milk metalloproteinase activity and vascular permeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 85, 137-145.