

## **CÉLULAS INMUNES CIRCULANTES DURANTE EL POSPARTO EN VACAS LECHERAS**

**Cainelli, Sofía**

*<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.*

Directora: Velázquez, Melisa M.L.

Codirector: Ortega, Hugo H.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Citometría, Bovinos, Células inmunes.

### **INTRODUCCIÓN**

Al comienzo de la lactancia, el ganado lechero experimenta cambios repentinos en la disponibilidad de nutrientes generándose un déficit energético durante el período posparto inmediato (Grummer y col., 2004). Estudios previos han relacionado este déficit de nutrientes con un estado de inmunosupresión (Suthar y col., 2013; Mann y col., 2019), ya que se ha observado que las vacas lecheras son más susceptibles a enfermedades infecciosas e inflamatorias como metritis y mastitis durante el posparto inmediato (Kehrli y Harp, 2001). En este sentido, el deterioro de la fagocitosis por parte de leucocitos polimorfonucleares y disminución de su actividad en relación al estallido oxidativo son claras evidencias de dicha inmunosupresión (Hoeben y col., 2000). Este período también está caracterizado por una menor capacidad de la respuesta de los linfocitos sanguíneos a la estimulación con agentes mitogénicos y por una menor producción de inmunoglobulina por parte de los linfocitos B (Nonnecke y col., 2003). Si bien, se han propuesto varias hipótesis que atribuyen el deterioro de las funciones inmunitarias durante el posparto a cambios endocrinos o metabólicos (Loiselle y col., 2009), no se ha profundizado en el estudio de la proporción de cada población de células inmunes durante el posparto, su variación por posible migración al endometrio, y la relación de estas alteraciones con la funcionalidad descrita de dichas células alrededor del momento de la concepción.

### **OBJETIVO**

Caracterizar el perfil de las células inmunes presentes en sangre periférica en vacas lecheras durante el posparto y la lactancia temprana, para valorar su potencial efecto sobre receptividad endometrial y consecuente logro de la preñez.

### **METODOLOGÍA**

**Animales y diseño experimental.** El estudio se realizó sobre 23 vacas Holando Argentino multíparas provenientes de un tambo comercial ubicado en la zona de influencia de la FCV (UNL). Previo al inicio del muestreo, se sincronizaron los ciclos estrales. Luego se corroboró

Título del proyecto: EFECTOS DE LA EXIGENCIA PRODUCTIVA DE LA LACTANCIA Y PREÑEZ SOBRE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS SISTÉMICOS Y ENDOMETRIALES EN VACAS LECHERAS

Instrumento: ANPCyT-PICT 2017-2197. (2019 – 2022)

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: ANPCyT

Director/a: Ortega, Hugo H.

la ovulación y formación de cuerpo lúteo mediante ultrasonografía transrectal. Se tomaron muestras de sangre a los 45 y 60 días posparto (dpp) durante la fase lútea; y se continuó con los muestreos de sangre a los 90 dpp, 120 dpp, 150 dpp y 180 dpp. Luego de los 60 dpp, los animales fueron re-sincronizados con el fin de realizarles el servicio por inseminación artificial. Se realizó el diagnóstico de preñez por tacto y ultrasonografía. Se recabaron datos individuales de producción láctea e índices reproductivos, y se examinó la condición corporal de los animales incluidos en el muestreo. Finalmente, los animales fueron agrupados según sus intervalos parto-concepción (IPC) de acuerdo a resultados previos de nuestro grupo de trabajo, resultando los siguientes grupos: (1) IPC bajo:  $98 \pm 9$  días,  $n = 11$ ; (2) IPC alto:  $168 \pm 15$  días,  $n = 8$  (Peralta y col., 2021).

**Toma y procesamiento de muestras.** Las muestras de sangre se tomaron por punción de vena yugular, y se conservaron con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en hielo. Los leucocitos totales fueron obtenidos por medio de la lisis de glóbulos rojos, y siguiendo la técnica descrita por otros autores (Renna y col., 2014). Las células se contaron en cámara hemocitométrica de Neubauer y se llevaron a una concentración adecuada para su conservación en nitrógeno líquido hasta su utilización ( $1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^8$  células/criovial conteniendo 500  $\mu$ l de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), suero fetal bovino (SFB) (5%) y 500  $\mu$ l de SFB con dimetilsulfóxido (DMSO) (20%) (Guzman y col., 2014).

**Evaluación y caracterización del perfil inmune a nivel sistémico.** Partiendo de los leucocitos totales obtenidas anteriormente, y mediante citometría de flujo, se evaluaron los porcentajes de poblaciones celulares circulantes tales como Macrófagos (MØ) (CD14), Linfocitos T (LT) (CD3, CD4 y CD8) y Linfocitos B (LB) (CD21). En cada ensayo se realizaron conjuntamente los controles negativos (células sin marca) y positivos (células con simple marca), necesarios para corroborar el correcto seteo de los voltajes de cada canal de fluorescencia. Las concentraciones utilizadas para cada anticuerpo marcado y su correspondiente fluorocromo se detallan en la **Tabla 1**. La estrategia de 'gating' se describe en la **Figura 1**. El análisis de los datos adquiridos por citometría de flujo se realizó utilizando el programa FlowJo (Izuka y col., 2008). Para la evaluación estadística se realizó un análisis de medidas repetidas utilizando el Modelo Lineal Generalizado (GLM) con distribución gamma o lineal (según correspondía en cada caso) y función de enlace logaritmo. Como factores fijos se seleccionaron 'IPC', 'DPP' y la interacción 'DPP\*IPC' (Angeli y col., 2019).

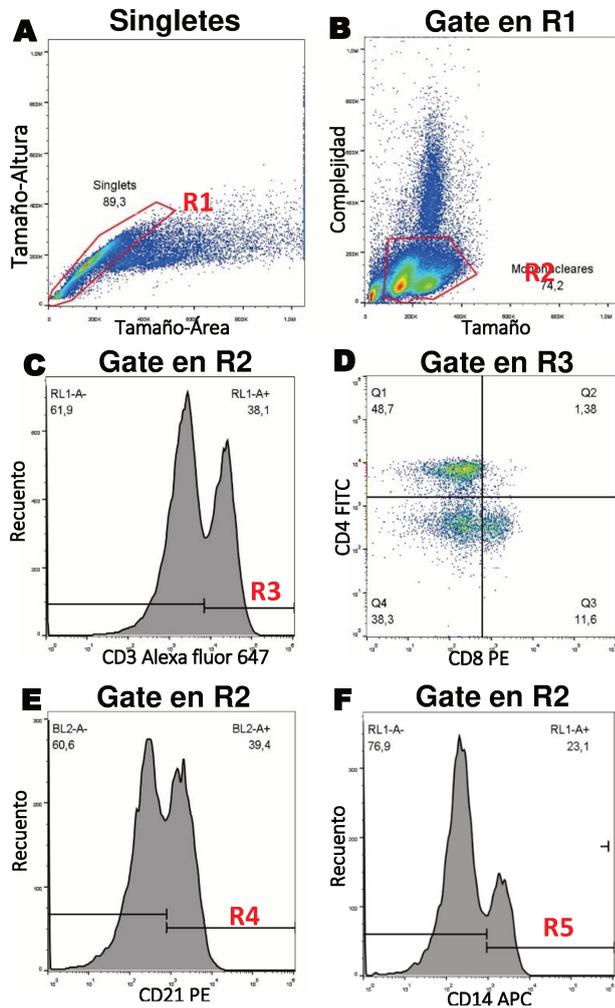
**Tabla 1.** Anticuerpos primarios, proveedores y condiciones utilizadas en citometría de flujo.

Anticuerpo	Clonalidad y marca	Volumen en 25 $\mu$ l finales
<b>APC anti-human CD14</b>	Monoclonal (Biolegend)	0,125 $\mu$ l
<b>PE anti-bovine CD21</b>	Monoclonal (Biorad)	0,5 $\mu$ l
<b>Alexa fluor 647 anti-human CD3</b>	Monoclonal (Biorad)	1 $\mu$ l
<b>FITC anti-bovine CD4</b>	Monoclonal (Biorad)	0,25 $\mu$ l
<b>PE anti-bovine CD8<math>\beta</math></b>	Monoclonal (Biorad)	0,5 $\mu$ l

## RESULTADOS

En relación al análisis entre grupos, los porcentajes de MØ (células CD14+) (**Figura 2A**) y LT CD8+ (células CD3+/CD8+) (**Figura 2D**) son significativamente mayores en el grupo de bajo IPC ( $p < 0,05$ ); mientras que los porcentajes de LB (células CD21+) (**Figura 2E**) son significativamente mayores en el grupo de alto IPC ( $p \leq 0,05$ ). Por otro lado, los porcentajes de LT totales (células CD3+) (**Figura 2B**) y LT CD4+ (células CD3+/CD4+) (**Figura 2C**) variaron significativamente a lo largo del tiempo en ambos grupos de animales ( $p < 0,05$ ). En relación a la interacción de los factores IPC\*DPP, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de LT CD4+ entre los grupos de IPC a los 120 dpp ( $p < 0,05$ ), y una tendencia a los 45 y 150 dpp ( $p < 0,1$ ) (**Figura 2C**). Asimismo, se observaron diferencias significativas en

el porcentaje de LT CD8+ entre los grupos de IPC a los 45, 60 y 180 dpp ( $p < 0,05$ ) (**Figura 2D**).

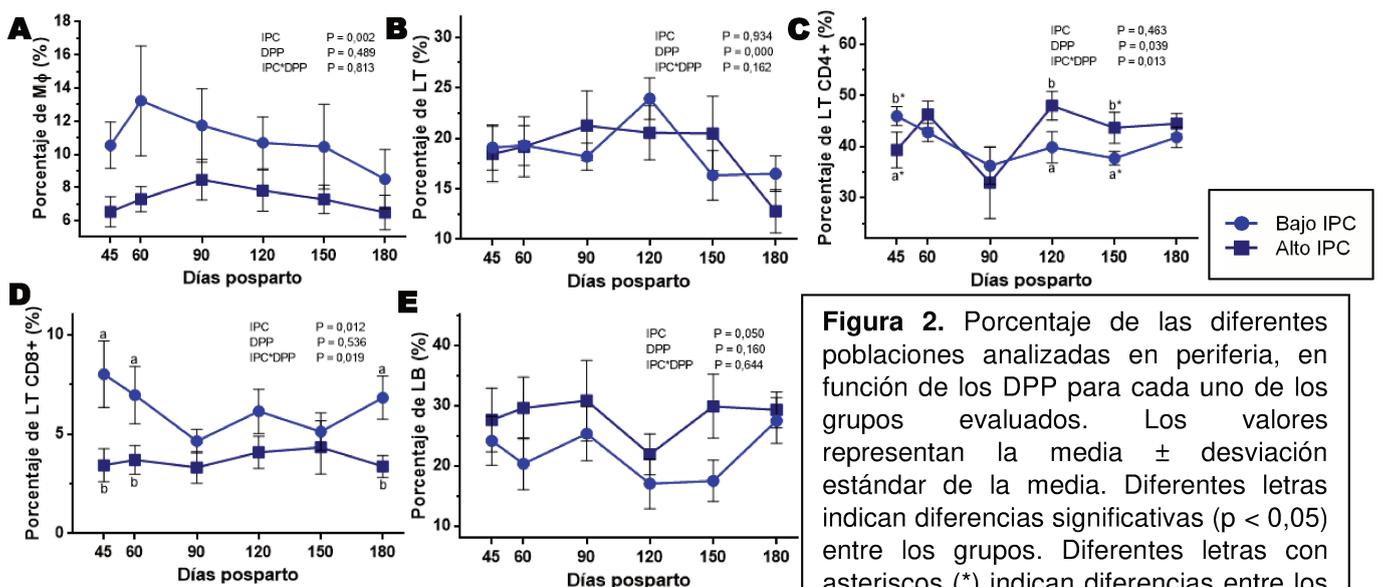


**Figura 1.** Estrategia de “gating” utilizada para el análisis de las poblaciones celulares. En primer lugar, se seleccionaron todos los eventos identificados como ‘singlets’ (células únicas, no aglomeradas) considerando la altura (FSC-H) en función del área (FSC-A) (**Figura 1A**). A partir de la región en ‘R1’ se analizó la complejidad citoplasmática (SSC-A) de cada evento en función del tamaño (FSC-A), y se generó el gate ‘R2’ que define a la población de células mononucleares (**Figura 1B**). Finalmente, a partir de ‘R2’ se discriminaron las poblaciones celulares en estudio, como se detalla a continuación:

→ **CD3/CD4/CD8:** Utilizando un histograma se determinó el porcentaje de eventos CD3+ que corresponden a los LT totales, y se lo denominó ‘R3’ (**Figura 1C**). A partir de ‘R3’ se realizó un gráfico de puntos Dot Plot que permitió obtener el porcentaje de eventos LT CD4+ (cuadrante superior izquierdo) y el porcentaje de eventos LT CD8+ (cuadrante inferior derecho) (**Figura 1D**).

→ **CD21:** Utilizando un histograma se determinó el porcentaje de eventos CD21+ que corresponden a los LB en ‘R4’ (**Figura 1E**).

→ **CD14:** Utilizando un histograma se determinó el porcentaje de eventos CD14+ que corresponden a los MØ en ‘R5’ (**Figura 1F**).



**Figura 2.** Porcentaje de las diferentes poblaciones analizadas en periferia, en función de los DPP para cada uno de los grupos evaluados. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos. Diferentes letras con asteriscos (\*) indican diferencias entre los grupos con  $p < 0,1$ .

## CONCLUSIONES

Las variaciones observadas en las diferentes poblaciones de células inmunes podrían estar influyendo indirectamente en la duración del IPC de los animales, debido a pérdidas embrionarias tempranas. Aquellos animales de bajo IPC presentaron mayores porcentajes de MØ y LT CD8+, y menores porcentajes de LB en comparación con las vacas de alto IPC. Sin embargo, los porcentajes de LT totales y LT CD4+ sólo variaron a lo largo del tiempo dentro de cada grupo y no hallamos diferencias entre los animales con diferente IPC. Debido a que el entorno inmunológico uterino puede verse influenciado por el perfil inmune sistémico, estas variaciones podrían afectar el diálogo materno fetal y consecuente establecimiento de la preñez.

## BIBLIOGRAFÍA

- Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A.** 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 20, 447-470.
- Guzman E, Hope J, Taylor G, Smith AL, Cubillos-Zapata C, Charleston B.** 2014. Bovine  $\gamma\delta$  T cells are a major regulatory T cell subset. *J Immunol.* 193(1), 208-222.
- Hoeben D, Monfardini E, Opsomer G, Burvenich C, Dosogne H, De Kruif A, Beckers JF.** 2000. Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *J. Dairy Res.* 67:249–259.
- Iizuka A, Ikarashi Y, Yoshida M, Heike Y, Takeda K, Quinn G, Wakasugi H, Kitagawa M, Takaue Y.** 2008. Interleukin (IL)-4 promotes T helper type 2-biased natural killer T (NKT) cell expansion, which is regulated by NKT cell-derived interferon- $\gamma$  and IL-4. *Immunology* 123(1), 100–107.
- Kehrli ME, Harp JA.** 2001. Immunity in the mammary gland. *Immunology* 17:495–516.
- Loiselle MC, Ster C, Talbot BG, Zhao X, Wagner GF, Boisclair YR, Lacasse P.** 2009. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *Journal of dairy science*, 92(5), 1900-1912.
- Mann S, Sipka AS, Grenier JK.** 2019. The degree of postpartum metabolic challenge in dairy cows is associated with peripheral blood mononuclear cell transcriptome changes of the innate immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 93, 28-36.
- Nonnecke BJ, Kimura K, Goff JP, Kehrli Jr M.** 2003. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 86:2359–2368.
- Peralta MB, Cainelli S, Stassi AF, Angeli E, Renna MS, Signorini ML, Gareis NC, Durante L, Rey F, Ortega HH, Salvetti NR, Velázquez MML.** 2021. Association between phagocytic activity of monocytes and days to conception after parturition in dairy cows when considering the hormonal and metabolic milieu. *Animal Reproduction Science*, 106818.
- Renna MS, Pereyra EAL, Baravalle C, Camussone C, Dallard BE, Marcipar IS, Calvino LF.** 2014. Functional role of antibodies generated in heifers through immunization with *Staphylococcus aureus* vaccines in invasion and phagocytosis assays. *FEMS Microbiology Lett* 360(1), 62-69.
- Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W.** 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of dairy science* 96, 2925-2938.
- Angeli E, Rodríguez FM, Rey F, Santiago G, Matiller V, Ortega HH, Hein GJ.** 2019. Liver fatty acid metabolism associations with reproductive performance of dairy cattle. *Animal reproduction science*, 208, 106104.