

ESTUDIO CINÉTICO DE POBLACIONES INMUNES DURANTE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA.

Engler, Carolina¹

¹Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL)/Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Directora Doctorado: Renna, María Sol
Codirectora Doctorado: Baravalle, Celina
Codirectora Beca Doctorado: Dallard, Bibiana E

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, infección intramamaria crónica, involución mamaria.

INTRODUCCIÓN

Al finalizar la lactancia, la involución normal de la glándula mamaria (GM) bovina es de fundamental importancia para asegurar una máxima producción de leche durante la lactancia siguiente. La fisiología de la GM en este período difiere marcadamente respecto de la presentada durante la lactancia, los cambios producidos en la composición de la secreción son producto de los cambios acontecidos en la fisiología de las células epiteliales alveolares. Durante la involución temprana comienzan a aumentar en forma significativa ciertas proteínas defensivas, así como células del sistema inmune; sin embargo, la aparición de nuevas infecciones intramamarias (IIM) se ve favorecida en esta etapa (Oliver y Sordillo, 1989).

La mastitis bovina es uno de los mayores factores limitantes a la rentabilidad de la producción lechera en el mundo. Si bien la enfermedad es causada por numerosos agentes etiológicos, *S. aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis tanto en Argentina, como en otros países de gran desarrollo lechero. Este microorganismo causa IIM con tendencia a la cronicidad, que generan un extenso daño al tejido y son refractarias a la terapia antibiótica (Ruegg, 2017). Se conoce ampliamente que la resistencia del hospedador frente a *S. aureus* está determinada por una coordinada interacción entre los mecanismos de defensa innatos y adaptativos.

Entre las células que participan en la inmunidad innata de la GM se encuentran los macrófagos que son la principal población en leche, en secreción de vaca seca y en tejido mamario. Estas células son fundamentales para orquestar y resolver la inflamación debido a que activan la respuesta inmune innata liberando citoquinas y mediadores proinflamatorios que facilitan la migración de neutrófilos y las actividades bactericidas de ambas poblaciones celulares (Gordon y Taylor, 2005). Por otro lado, los macrófagos facilitan la inducción de la respuesta inmune adaptativa mediante el procesamiento y presentación de antígenos debido a actúan como células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales (Sordillo, 2018).

Título del proyecto: Estudio de los mecanismos inmunes innatos durante la infección de la glándula mamaria bovina por *Staphylococcus aureus*: Rol de los linfocitos T gamma delta (T γ δ).

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director/a: Renna, María Sol

La iniciación y la regulación de la respuesta inmune adaptativa son fundamentales para la resolución de la infección cuando las defensas innatas no logran eliminar completamente los patógenos causantes de mastitis. Particularmente, los linfocitos pueden reconocer una amplia variedad de estructuras antigénicas a través de receptores de membrana que definen la especificidad, diversidad, memoria y reconocimiento de lo propio y no propio del sistema inmune. Los linfocitos T (LT) pueden dividirse en dos grandes poblaciones, dependiendo de la expresión de marcadores de superficie, del tipo de citoquina secretada y de su función efectora: T *helper* o colaboradores (CD4+) y T citotóxicos (CD8+). Por otro lado, el principal rol de los linfocitos B (LB) es el de producir anticuerpos contra patógenos invasores. De manera similar a los macrófagos y células dendríticas, estos linfocitos pueden funcionar como CPA.

La importancia funcional de las diferentes poblaciones celulares inmunes que se encuentran en la GM bovina durante la involución activa no se ha dilucidado completamente. El número y distribución de las mismas son importantes para el éxito de las defensas contra los patógenos de mastitis y/o en la recuperación de la infección.

OBJETIVO

Evaluar la cinética de reclutamiento de las diferentes poblaciones celulares inmunes en secreciones mamarias provenientes de vacas libres de IIM y crónicamente infectadas con *S. aureus* durante el período de involución activa.

METODOLOGÍA

Se utilizaron vacas Holando Argentino, no preñadas, en el tercio final de la lactancia, pertenecientes al tambo de la Escuela de Agricultura Ganadería y Granja (UNL). 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 los cuartos mamarios. Se utilizaron cuartos mamarios libres de IIM (n=10) y cuartos con IIM crónicas por *S. aureus* (n=10). Las vacas con IIM crónicas por *S. aureus* fueron seleccionadas en base a resultados de recuentos de células somáticas mensuales (RCS > 250x10³ células/ml) y análisis bacteriológico positivo. Un cuarto fue considerado crónicamente infectado por *S. aureus* luego del aislamiento de la bacteria en tres muestreos consecutivos con intervalos de 21 días. Por otra parte, se seleccionaron vacas controles con cuartos libres de IIM al tiempo de muestreo, con resultados bacteriológicos negativos y RCS menores a 150x10³ células/ml. Todos los procedimientos utilizados en este estudio se realizaron de acuerdo a las normas correspondientes sobre experimentación animal (Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Federation of Animal Science Societies. Third edition. 2010. ISBN: 978-1-884706-11-0) y aprobados por el CAES de la FCV-UNL. Se obtuvieron muestras de secreción mamaria en forma aséptica a los 7, 14 y 21 días post secado. Las muestras fueron conservadas a 4°C e inmediatamente procesadas para realizar el enriquecimiento en células mononucleares (CMN) mediante centrifugación en gradiente de densidad (Histopaque 1077). Posteriormente, las CMN se incubaron con los anticuerpos correspondientes para cada población en PBS-EDTA-suero fetal bovino a 4°C durante 30 min en oscuridad: monocitos-macrófagos (anti-CD14), LT *helper* o colaboradores (anti-CD3, anti-CD4), LT citotóxicos (anti-CD3, anti-CD8) y LB (anti-CD21). Luego de la incubación, las CMN fueron lavadas, resuspendidas en fluido de enfoque y adquiridas utilizando el citómetro de flujo Attune NxT. Para determinar el efecto de la IIM sobre las variables evaluadas, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de medidas repetidas (MRANOVA). Para evaluar diferencias en cada tiempo de muestreo entre cuartos sanos y crónicamente infectados se realizó t-Student. Se consideraron significativas las diferencias

de $p < 0,05$. Para el análisis de los porcentajes de las poblaciones celulares inmunes durante los diferentes días de la involución evaluados, se realizó ANOVA y post test de Duncan para cada grupo experimental (libres de IIM e infectado crónico). Se utilizó el programa SPSS 23.0 para Windows, los datos se presentaron como la media \pm error estándar de la media (EEM).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se observó un efecto significativo de la infección por *S. aureus* sobre los porcentajes de monocitos-macrófagos de secreción durante la involución ($p < 0,001$). Al día 7, 14 y 21, los porcentajes de estas células innatas fueron menores en secreciones provenientes de cuartos infectados con respecto a cuartos libres de IIM ($p < 0,001$, $p = 0,07$ y $p = 0,018$, respectivamente). Tanto en secreciones de cuartos infectados crónicos como libres de IIM, el porcentaje de monocitos-macrófagos fue menor al día 21 de la involución con respecto al día 7 y 14 ($p = 0,07$ y $p = 0,01$, respectivamente).

En cuanto a los LT *helper* o colaboradores, no se observó un efecto significativo de la infección por *S. aureus* sobre los porcentajes de estas células durante los periodos evaluados ($p = 0,346$). Si bien en ambos grupos experimentales se observó un mayor porcentaje de LT colaboradores al día 7 de la involución comparado con el día 14 y 21, solo en el grupo libres de IIM esta diferencia fue significativa ($p < 0,001$).

Se observó un efecto significativo de la infección por *S. aureus* sobre los porcentajes de LT citotóxicos de secreción durante la involución ($p = 0,012$). Al día 7, 14 y 21, los porcentajes de estas células inmunes fueron menores en secreciones provenientes de cuartos infectados con respecto a cuartos libres de IIM ($p = 0,004$, $p = 0,024$ y $p = 0,039$, respectivamente).

Por último, si bien no se observó un efecto de la infección a lo largo del tiempo de involución en los porcentajes de LB de secreción entre los cuartos infectados con *S. aureus* y cuartos libres de IIM ($p = 0,692$), cuando se evaluó el porcentaje de estas células en ambos grupos por día de involución, se observó una disminución en el porcentaje de LB en las secreciones mamarias provenientes de cuartos infectados en comparación con secreciones de cuartos libres de IIM al día 7 de la involución ($p = 0,02$). Por otro lado, en secreciones de cuartos infectados crónicos se observó una disminución significativa en el porcentaje de LB al día 7 de la involución en comparación con el día 14 y 21 ($p = 0,05$). En cambio, en secreciones de cuartos libres de IIM, se observó un aumento significativo en el porcentaje de esta población celular inmune al día 21 de la involución en comparación con el día 7 y 14 ($p < 0,001$).

En función de los resultados se puede concluir que las variaciones en los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares provenientes de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus*, podría relacionarse con la capacidad que posee la bacteria de sobrevivir y persistir en células de la GM. El no reconocimiento por parte del sistema inmune conduciría no solo a una menor estimulación de la respuesta inmune innata y consecuentemente a una menor atracción de células inflamatorias a la GM, sino también a una menor estimulación de la respuesta inmune adaptativa. Por otro lado, las variaciones en los porcentajes de las diferentes poblaciones inmunes evaluadas en animales libres de IIM podrían estar relacionadas con una respuesta esencial al intenso proceso de remodelación tisular que ocurre durante la involución de la GM bovina. En general, los resultados de este estudio aportan nuevos conocimientos sobre el comportamiento de las diferentes poblaciones inmunes y su posible participación en la cronicidad del proceso infeccioso en la GM bovina durante el período de involución activa.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Gordon S, Taylor PR. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nature Reviews Immunology 5 (12): 953-964

Oliver SP, Sordillo LM. 1989. Approaches to the manipulation of mammary involution. Journal of Dairy Science. 72: 1647-1664.

Ruegg PL. 2017. A 100-year review: mastitis detection, management and prevention. Journal of Dairy Science 100: 10381-10397.

Sordillo, LM. 2018. Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, 34(3): 507-523.