

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

La infección crónica por *Staphylococcus aureus* induce cambios en el balance proliferación-apoptosis en la glándula mamaria bovina durante la involución activa.

Andreotti CS^{1,2}, Pereyra EA^{1,2}, Sacco SC^{1,2}, Baravalle C^{1,2}, Renna MS^{1,2}, Ortega HH^{1,2}, Calvinho LF^{3,4}, Dallard BE^{1,2}

csandreotti@yahoo.com.ar

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. ²Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral), UNL-CONICET. ³Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). ⁴Cátedra de Infectología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

Trabajo enmarcado en el Proyecto PICT 2010 (2011-2014), Cód. 0872, denominado: “Mecanismos inmunológicos que intervienen en la infección de la glándula mamaria bovina por *Staphylococcus aureus*”. Proyecto financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica según Resolución N° 98/11. Directora: MV Bibiana Dallard.

Durante el periodo de involución, en la glándula mamaria (GM) bovina, se produce un importante proceso de remodelación que implica regresión (apoptosis), proliferación y diferenciación de las células mamarias a los fines de prepararse para la lactancia siguiente ¹. Durante la involución temprana aumenta el riesgo de infecciones intramamarias (IIM) relacionadas con cambios morfológicos que facilitan la penetración bacteriana por el canal del pezón, al interferir con los mecanismos de defensa naturales y favorecer el crecimiento bacteriano ³. La mastitis bovina, es reconocida mundialmente como la enfermedad que más pérdidas ocasiona en el ganado lechero, generando graves daños al tejido mamario. Dicho daño puede estar inducido por dos mecanismos principales de muerte celular: necrosis o apoptosis, diferenciadas por los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que se producen en las células destinadas a morir ². *Staphylococcus aureus* es un patógeno mayor de la GM que causa principalmente mastitis subclínicas y crónicas que responden pobremente a la terapia antibiótica ⁴. El objetivo de este trabajo fue evaluar los procesos de proliferación y apoptosis durante la involución de la GM bovina, en cuartos sanos en relación a infectados crónicos por *S. aureus*, cuantificando la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), de la proteína antiapoptótica Bcl2, de la proteína proapoptótica Bax y del receptor Fas por inmunohistoquímica (IHQ); e identificando apoptosis *in situ* por TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling*). Se utilizaron vacas Holstein no preñadas, en la etapa final de la lactancia. Se obtuvieron muestras de tejido mamario a los 7, 14 y 21 días luego del último ordeño. Cuartos sanos (n=8) e infectados crónicos por *S. aureus* (n=8) fueron incluidos en cada grupo (7, 14 y 21 días). Los tejidos fueron incluidos en parafina. Se realizó IHQ utilizando anticuerpos primarios específicos y el sistema de revelado estreptavidina-peroxidasa-DAB, tanto para evaluar la proliferación (anti-PCNA) como para analizar las proteínas reguladoras de la apoptosis (anti-Bcl2, Bax y el receptor Fas). Por otro lado, para evaluar el porcentaje de células en apoptosis se utilizó la técnica TUNEL mediante el kit Apop Tag® Plus–Peroxidasa (Chemicon) que permitió la marcación enzimática de la ruptura de las cadenas de ADN y la detección de apoptosis *in situ*. Para la cuantificación de la expresión proteica, y para la obtención de los porcentajes de proliferación y apoptosis se empleó el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetic). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA factorial que evalúa los efectos de la IIM, del tiempo y la interacción. Para evaluar diferencias en cada tiempo de muestreo entre cuartos sanos e infectados se realizó *t*-student. En el parénquima mamario el análisis de los porcentajes de proliferación, evaluados a través de la expresión nuclear de PCNA,

AREA TEMATICA: SALUD ANIMAL

reveló un efecto significativo de la IIM y del tiempo de muestreo ($p < 0,001$), mientras que la interacción entre ambos factores no fue significativa ($p = 0,725$); a su vez en los cuartos infectados los porcentajes de proliferación fueron mayores respecto de los sanos en todos los períodos evaluados ($p < 0,05$). En el estroma mamario, se observó un efecto significativo del tiempo de muestreo ($p < 0,001$), mientras que el efecto de la IIM no fue significativo ($p = 0,50$) ni existió interacción ($p = 0,057$); tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de proliferación en entre cuartos infectados y sanos en ninguno de los tiempos evaluados ($p > 0,05$). En cuanto a las proteínas reguladoras de la apoptosis evaluadas, los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl2 se vieron afectados por la IIM ($p < 0,001$) y por el tiempo de la involución ($p < 0,001$), observándose interacción entre ambos factores ($p = 0,01$). Los porcentajes de inmunomarcación para Bcl2 fueron mayores en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). En cuartos infectados, los mayores porcentajes de expresión de Bcl2 se observaron al día 21 de la involución ($p < 0,05$). La expresión de la proteína Bax se vio influenciada por la IIM ($p < 0,001$), observándose mayores porcentajes de inmunomarcación en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). La expresión de Fas se vio influenciada por la IIM ($p < 0,001$) y por el tiempo de la involución ($p < 0,001$), observándose interacción entre ambos factores ($p = 0,003$). Los porcentajes de inmunomarcación para Fas fueron mayores en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). En relación a la apoptosis, en el parénquima mamario, el análisis de los porcentajes de células reactivas a la técnica de TUNEL reveló un efecto de la IIM ($p = 0,023$) y del tiempo de muestreo ($p < 0,001$), no observándose interacción entre los factores ($p = 0,221$). Por otra parte, se observaron mayores porcentajes de apoptosis en cuartos infectados respecto de sanos al día 21 de la involución ($p = 0,006$), mientras que al día 7 ($p = 0,123$) y 14 ($p = 0,679$) no se observaron diferencias. En el estroma mamario, se observó un efecto significativo de la IIM ($p < 0,001$) y del tiempo ($p < 0,001$), no observándose interacción entre los factores ($p = 0,342$). Los porcentajes de células apoptóticas fueron mayores en los cuartos infectados respecto a los no infectados en los tres períodos evaluados ($p < 0,05$). A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que los mayores porcentajes de proliferación y apoptosis, así como el comportamiento diferencial de las proteínas reguladoras de la apoptosis evaluadas, en cuartos infectados respecto a sanos, podrían representar un intento de la GM para contrarrestar el daño causado por la infección crónica por *S. aureus*. Estas alteraciones podrían afectar el proceso de remodelación de la GM, conduciendo así a una disfunción de la misma y a una deficiente producción de leche.

Bibliografía

- ¹ Capuco, A.V.; Akers, R.M.; Smith, J.J. (1997). Mammary growth in Holstein cows during the dry period: Quantification of nucleic acids and histology. *Journal of Dairy Science* 80 477–487
- ² Friedlander, M. R. (2003). Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *The New England Journal of Medicine* 348, 1365-75.
- ³ Oliver, S.P.; Sordillo, L.M. (1989). Approaches to the manipulation of mammary involution. *Journal of Dairy Science* 72, 1647–1664.
- ⁴ Zecconi, A.; Calvino, L.; Fox, L. (2006). *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin of International Dairy Federation*, 408, 1–36.